

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

ESCUELA DE POSGRADO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO

**“RESISTENCIA A *Phytophthora infestans* EN *Solanum tuberosum* VAR. DESIREE MEDIANTE LA
INTRODUCCIÓN DEL GEN RB”**

**PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAGISTER EN BIOLOGÍA
MOLECULAR**

AUTOR

María Lupe Román Horna

Lima – Perú

2015

RESUMEN

Una de las opciones para el control de la enfermedad más devastadora del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*), el tizón tardío, producido por *Phytophthora infestans*, es el desarrollo de variedades resistentes a este patógeno, mediante la transferencia directa de genes de resistencia R por ingeniería genética. En el siguiente trabajo de investigación, se usó el gen RB de *Solanum bulbocastanum*, que otorga un amplio espectro de resistencia a razas de *P. infestans*. Para dicho fin, se transformó genéticamente vía *Agrobacterium tumefaciens* la variedad susceptible de papa Desiree (*Solanum tuberosum*) con el vector binario pCIP68 que contiene el gen RB.

Como resultado, se obtuvieron 19 plantas transformadas con el gen RB, confirmadas por la prueba de resistencia a kanamicina y por la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las 19 plantas transgénicas fueron sometidas a infección en invernadero bajo condiciones de bioseguridad con el aislamiento POX067 de *P. infestans* perteneciente al linaje clonal EC-1 que es dominante en el Perú. Tres de las 19 plantas ([RB]54, [RB]56 y [RB]70) presentaron un alto nivel de resistencia al aislamiento POX067 de *P. infestans*.

Palabras clave: *Phytophthora infestans*; gen RB; papa; transgénico; gen R.

ABSTRACT

One of the options for the control of the most devastating disease in potato cultivar (*Solanum tuberosum*), late blight, produced by *Phytophthora infestans*, is the development of resistant varieties to this pathogen mediated by the direct transfer of resistance R genes through genetic engineering. In the present work, we used RB gene from *Solanum bulbocastanum* to confer broad spectrum resistance to *P. infestans* races. To that end, Agrobacterium-mediated genetic transformation was used to transform a susceptible potato variety, Desiree, with the binary vector pCIP68 harboring the RB gene.

As a result, 19 transformed plants containing the RB gene were obtained. kanamycin resistance test and polymerase chain reaction (PCR) assays confirmed the integration of the T-DNA in the potato genome. The 19 transformed plants, also called transgenic events were subjected to infection under biosafety greenhouse conditions. *Phytophthora infestans* isolate POX067 of the EC-1 clonal lineage, commonly find in Peru, was used for the infection. Three of the 19 plants ([RB]54, [RB]56 and [RB]70) show high resistance levels to isolate POX067 of *P. infestans*.

Keywords: *Phytophthora infestans*; RB gene; potato; transgenic; R gene.

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADN-T	ácido desoxirribonucleico de transferencia
ANA	Ácido naftalenacético
ARN	Ácido ribonucleico
<i>Avr</i>	gen de avirulencia
BAP	Benzilaminopurina
CIP	Centro Internacional de la Papa
CTAB	Bromuro de cetil-trimetil-amonio
dNTP	Desoxi rribonucleósidos t ri -fosfato
EDTA	ácido etilen diamino tetra acético
Km	kanamicina
MS	Sales de Murashinge y Skoog
<i>nptII</i>	Neomicina fosfot ransferesa II
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>R</i>	gen de resistencia
RB	gen de resistencia de <i>Solanum bulbocastanum</i>
RH	respuesta hipersensible
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
TBE	Tris-Borato-EDTA
Tris [®] -HCL	tris hidroximetil aminometano
UV	Ultravioleta

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ABREVIATURAS	iii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 <i>Phytophthora infestans</i> , agente causal del Tizón tardío	3
2.2 Interacción Planta – patógeno y respuesta hipersensible	5
2.3 Resistencia a <i>P. infestans</i>	8
2.4 Gen RB	9
2.5 Proteínas presentes durante la resistencia a <i>P. infestans</i> mediada por el gen <i>RB</i>	11
2.6 <i>Solanum tuberosum</i> variedad Desiree	12
2.7 Transformación Genética de Plantas	13
2.7.1. Sistema de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13
2.7.2 Vectores de clonación	14
2.7.2.1 Vectores cointegrados	15
2.7.2.2 Vectores binarios	15
2.7.2.2.1 Vector pBIN20	17
2.8 Genes marcadores de selección	17
2.9 Planteamiento del problema	18
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	19
3.1 Hipótesis	19
3.2 Objetivos	19
3.2.1 Objetivo general	19
3.2.2 Objetivos específicos	19
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1 Material vegetal y propagación <i>in vitro</i>	20
4.2 Material y cultivo bacteriano	20
4.3 Aislamiento del patógeno	21
4.4 Transformación genética de <i>S. tuberosum</i> var. Desiree	21
4.4.1 Selección y regeneración de los explantes transformados	22
4.4.2 Cosecha y propagación de posibles eventos transgénicos	22
4.5 Prueba de Resistencia a kanamicina	23
4.6 Análisis moleculares: prueba de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	24
4.6.1 Extracción de ADN a pequeña escala	24
4.6.2 Reacción de la PCR	25

	Pág.	
4.6.3	Condiciones de amplificación de la PCR	27
4.7	Trasplante del material bajo condiciones de invernadero	28
4.8	Prueba de infección en planta entera con <i>P. infestans</i>	28
4.9	Análisis estadístico	29
4.10	Nivel de expresión del gen RB mediante RT-qPCR	29
4.10.1	Extracción de ARN	30
4.10.2	Síntesis de ADNc	31
4.10.3	Eficiencias de la PCR de los genes RB y ef1α	33
4.10.3.1	Reacción de la RT-qPCR	33
4.10.3.2	Condiciones de amplificación de la RT-qPCR	34
4.10.4	Amplificación y cuantificación relativa del gen RB	34
4.10.5	Análisis estadísticos	35
4.11	Prueba de Southern blot	35
4.11.1	Extracción de ADN vegetal a mediana escala	37
4.11.2	Digestión del ADN vegetal	37
4.11.3	Preparación del a sonda	38
4.11.4	Corrida electroforética del gel de agarosa	39
4.11.5	Transferencia del ADN	39
4.11.6	Hibridación de la membrana	41
4.11.7	Detección de la sonda	41
4.11.8	Revelado	42
V. RESULTADOS		43
5.1	Transformación genética	43
5.2	Prueba de Infección con el patógeno en invernadero	46
5.3	Nivel de expresión del gen RB mediante RT-qPCR	50
5.3.1	Eficiencia de PCR del gen RB	50
5.3.2	Eficiencia de PCR del gen de referencia ef1α	50
5.3.3	Expresión relativa del gen RB de los eventos transgénicos	51
5.4	Prueba de southern blot	52
VI. DISCUSIÓN		54
VII. CONCLUSIONES		58
VIII. RECOMENDACIONES		59
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		60
X. ANEXOS		68

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Phytohthora infestans</i>	3
Figura 2. Vector cointegrado	15
Figura 3. Vector binario	16
Figura 4. Plántulas de papa <i>Solanum tuberosum</i> L var. Desiree cultivadas <i>in vitro</i>	20
Figura 5. Metodología de transformación genética	23
Figura 6. Mapa físico del vector pCIP68 indicando la región amplificada con los iniciadores RGA-B y km-1	26
Figura 7. Metodología para muestrear los eventos transgénicos infectados con <i>P. infestans</i>	30
Figura 8. Mapa físico del vector pCIP68 mostrando la sonda y el sitio de restricción con la enzima <i>EcoRI</i>	36
Figura 9. Esquema del montaje de la membrana de souhtern Blot	40
Figura 10. Regenerantes de 6 semanas de edad de la variedad Desiree sin transforma	43
Figura 11. Regenerantes sometidos a transformación de 6 semanas de edad de la variedad Desiree	44
Figura 12. Formación de callos de hojas transformadas con el gen RB	44
Figura 13. Calidad de muestras de ADN a pequeña escala de los posibles eventos transgénicos	45
Figura 14. Posibles eventos de la variedad Desiree transgénicos positivos para la prueba de PCR con los iniciadores km-1	45
Figura 15. Eventos de la variedad Desiree positivos para la prueba de PCR con los iniciadores <i>RGA-B</i>	46
Figura 16. Desiree control y Desiree [RB] 54	49
Figura 17. Desiree control y Desiree [RB] 56	49
Figura 18. Desiree control Desiree [RB] 70	49
Figura 19. Yungay (Susceptible) y Lbr40 (Resistente)	49

	Pág.
Figura 20. Eficiencia del gen RB calculada a partir de la pendiente de la curva	50
Figura 21. Eficiencia del gen <i>ef1α</i> calculada a partir de la pendiente de la curva	51
Figura 22. Expresión relativa del gen RB en los eventos transgénicos	51
Figura 23. Corrida electroforética de los eventos transgénicos digeridos con la enzima <i>EcoRI</i>	52
Figura 24. Película revelada de la membrana de Southern blot	53
Figura 25. Variedad Desiree a las 3 semanas de edad	83
Figura 26. Contacto del bisturí con la bacteria <i>A. tumefaciens</i> que contiene el vector pCIP68	83
Figura 27. Retiro de las plántulas de las magentas mediante el corte con el bisturí	83
Figura 28. Retiro de las hojas con peciolo de las plántulas	83
Figura 29. Corte transversal de entrenudos de las plántulas con el bisturí que contiene <i>A. tumefaciens</i>	83
Figura 30. Entrenudos infectados con <i>A. tumefaciens</i> en medio de co- cultivo MS	83

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características de las bacterias utilizadas para la transformación genética	20
Tabla 2. Iniciadores utilizados en la prueba de la PCR	26
Tabla 3. Componentes usados para prueba de PCR	27
Tabla 4. Condiciones usadas para la amplificación del ADN	27
Tabla 5. Iniciadores usados para la prueba de RT-qPCR	33
Tabla 6. Elementos usados para prueba de PCR	34
Tabla 7. Programa de RT-qPCR utilizando el termociclador Applied Biosystems StepOne™	34
Tabla 8. Elementos empleados en la digestión genómica del ADN	38
Tabla 9. Elementos para la preparación de la sonda	38
Tabla 10. Condiciones del programa de PCR	39
Tabla 11. Resumen de la transformación genética en la variedad Desiree	46
Tabla 12. Valores mostrados como promedios y \pm desviación estándar ajustadas a la escala de Malcolmson al quinto día de lectura de los 19 eventos transgénicos con el gen RB	47
Tabla 13. Agrupación de los eventos transgénicos con el gen RB en relación a su resistencia contra <i>P. infestans</i> mediante la prueba de Kruskal Wallis	48
Tabla 14. Número total de copias insertadas por evento transgénico	53

I. INTRODUCCIÓN

La papa *Solanum tuberosum* representa el 50% de toda la producción mundial de tubérculos, es el cuarto cultivo alimentario del mundo junto con el trigo, maíz y el arroz y es de origen peruano (FAO 2006; Spooner & Hettterscheid 2006). Así mismo, este recurso alimenticio posee el mayor contenido de proteínas (aprox. 2,1% del peso fresco) entre los cultivos de raíces y tubérculos andinos, siendo importante por su contenido de aminoácidos adecuados a las necesidades humanas (Doehlonan & Sleper 1995).

Más de 250 enfermedades pueden atacar al cultivo de papa, siendo ocasionadas por plagas de bacterias, virus, hongos, algas y nemátodos. Sin embargo, el principal patógeno que ataca a este cultivo a nivel mundial es el oomiceto *Phytophthora infestans* causante de la enfermedad tizón tardío (Gebhart & Valkonen 2001). En los países en desarrollo, esta enfermedad afecta a 3 millones de hectáreas de tierras productoras de papa, siendo las pérdidas agrícolas alrededor de 2,750 millones de dólares al año. A nivel mundial ese patógeno causa el 10-15% de pérdida de la producción global por año. El valor económico de esta pérdida y el costo de protección de la cosecha se estima en 6 mil millones de dólares anualmente (Haverkort et al. 2009).

La principal medida durante los últimos años para contrarrestar esta pérdida ha sido la aplicación de productos fitosanitarios de origen biológico o químico. Su principal desventaja es que pueden conllevar a efectos perjudiciales para la salud y el medio ambiente (Mendoza 1998). Debido a esto, la mejor alternativa sigue siendo la mejora genética para desarrollar nuevas variedades con resistencia a dicho patógeno. Las variedades comerciales de papa son tetraploides y altamente heterocigotas, desarrollándose más lento que los otros cultivos importantes como el maíz y el trigo. En un estudio de caso, la variedad Canchan-INIAA demoró 11 años en ser liberada desde el primer cruzamiento y 18 años para ocupar hoy el 30% del mercado de papa fresca (Abad & Abad 1995). Por lo tanto, la producción de una nueva variedad de papa con resistencia a tizón tardío podría demorar hasta 30 años antes de llegar a ser una variedad importante.

Como alternativa al largo tiempo que se necesita para conferir resistencia al tizón tardío mediante los métodos convencionales del mejoramiento genético de papa, la efectividad y rapidez de la transferencia directa de genes mediante *A. tumefaciens* resultó una herramienta atractiva porque en un periodo de tres años se podría obtener una nueva planta transformada con resistencia al tizón tardío (1 año en laboratorio, 1 año en invernadero, 1 año en campo).

Hasta la fecha se sigue utilizando proteínas R de otras especies silvestres de papa con amplio espectro de resistencia a razas de *P. infestans* que conllevó a la obtención de plantas de papa transformadas con genes R que muestran altos niveles de resistencia a diversos linajes clonales de *P. infestans*: US-1 (Kuhl et al. 2007, Song et al. 2003), US-8 (Song et al. 2003, Kramer et al. 2009), US-10 (Halterman et al. 2008), US-14 (Bradeen et al. 2009), predominantes en África y en EE. UU., tanto en pruebas de invernadero como en campo. En el Perú, el linaje clonal EC-1 demostró ser agresivo y resistente a metalaxil (Perez et al. 2009).

En el presente trabajo se transformó genéticamente la variedad Desiree con el gen RB de *Solanum bulbocastanum* vía *A. tumefaciens* para inducir resistencia al aislamiento POX067 de *P. infestans* pertenecientes al linaje clonal EC-1, predominante en Sud América (Ecuador y Perú).

II. ANTECEDENTES

2.1 *Phytophthora infestans*, agente causal del Tizón tardío

Considerado el patógeno más destructivo del cultivo de papa, pertenece al Reino Protista clasificado como un oomiceto relacionado a las algas pardas. Las plantas hospedantes más importantes son la papa (*Solanum tuberosum*), el pepino (*S. muricatum* Ait.) y el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Ocasionalmente afecta a la berenjena (*S. melongena*) y a muchas especies de la familia Solanaceae (Abad & Abad 1995). Este patógeno ocasionó la hambruna irlandesa en el siglo 19 y la migración de la población a EEUU, dejando de esta manera un gran efecto en la historia humana (Erwin & Ribeiro 1996).

P. infestans se caracteriza por presentar un ciclo de vida complejo, que se divide en ciclo asexual y sexual, el primero sólo requiere del tipo de apareamiento A1 presente en todas las zonas paperas del mundo o solo el tipo apareamiento A2. En el caso del ciclo sexual, necesita obligatoriamente la presencia de los dos tipos de apareamiento A1 y A2, los cuales representan a los gametos sexuales (anteridio y oogonio) presentes en dos hifas separadas (Agrios 1995; figura 1).

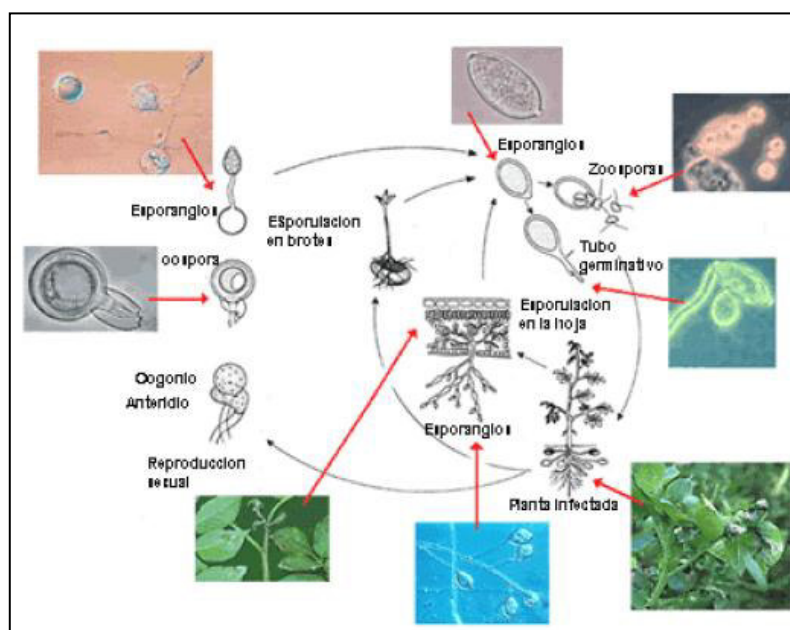


Figura 1. Ciclo de vida de *Phytophthora infestans*. Fuente: Adaptado de Hooker, 1980.

La infección se produce al descender las temperaturas entre 12 a 15°C, y al incrementarse la humedad aproximadamente hasta 100%. El patógeno penetra en la planta como en el tubérculo a través de heridas, lenticelas o por penetración directa a través de la epidermis (Alonso 2002). En caso del ciclo sexual, el patógeno produce crecimiento de filamentos miceliales dentro de la célula o espacios intercelulares produciendo esporangios. Estos se diseminan para dar lugar al tubo germinativo si es germinación directa; o zoosporas si es germinación indirecta, seguido por la germinación del quiste, formación del apresorio y de haustorios, los cuales secretan proteínas efectoras que alteran la fisiología del huésped facilitando la colonización (Kamoun et al. 2006) y causando manchas necróticas en la epidermis del hospedero, llamadas lesiones esporulantes, síntoma más común de la infección por *Phytophthora* (Coffey & Gees 1991). En el ciclo sexual, la diferencia se da cuando se cruzan los gametos lo cual origina primero a las oosporas y luego germina directamente en esporangios para continuar con los otros estadios del ciclo asexual. En este ciclo, el patógeno desarrolla enormes ventajas en comparación al estado asexual de propagación, ya que presenta alta variabilidad genética (Drenth et al. 1993).

El genoma de *P. infestans* tiene un tamaño de 240 Mb, está compuesto en su mayoría por regiones altamente repetitivas los cuales presentan características muy dinámicas (~74%) (Haas et al. 2009). Estudios en el secuenciamiento de este genoma demostraron que los genes que codifican a los efectores y otros genes que son inducidos durante la infección, se encuentran localizados en regiones altamente repetitivas y escasas en genes, en comparación con los genes esenciales o “housekeeping” que se encuentran en regiones no repetitivas y densas en genes. Por lo tanto, estas regiones donde se encuentran estos genes efectores promueven la plasticidad evolutiva y aumenta la variación genética de este grupo de genes determinando su patogenicidad (Raffaele et al. 2010). Otras posibles fuentes de variación de *P. infestans* son la reproducción sexual, mutación, recombinación mitótica, parasexualidad, migración y selección que conllevan a generar razas más agresivas. Los marcadores más utilizados para caracterizar las poblaciones de este patógeno han sido la virulencia, tipo de apareamiento (A1 o A2), isoenzimas, haplotipos mitocondriales, polimorfismos en la longitud de

fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en ingles), resistencia a fungicidas como al metalaxil y otras fenilamidas (Perez & Forbes 2008).

2.2 Interacción Planta – Patógeno y respuesta hipersensible

Las plantas se encuentran en continuo contacto con diferentes microorganismos, siendo muchos de ellos potencialmente patogénicos. Sin embargo, las plantas normalmente permanecen sanas debido a la manifestación de varios mecanismos de defensa como la presencia de tricomas, deposición de ceras, presencia de capas gruesas de cutículas, síntesis de ligninas, etc. Por otro lado, las plantas también han implementado mecanismos moleculares de defensa, entre los cuales se registra a los genes de resistencia *R* (Ordeñana 2002).

Estos genes pueden clasificarse en genes menores y genes mayores. Los primeros confieren resistencia inespecífica ante varios agresores, también llamado resistencia horizontal de carácter cuantitativo asociados con caracteres morfológicos y fisiológicos de la planta. Mientras que los genes mayores confieren resistencia específica a la planta frente al patógeno, también llamado resistencia vertical y tiene carácter cualitativo, casi siempre son dominantes a esta clasificación como por ejemplo los genes R1-R11 de *S. demissum* (Ordoñez 1993), RB, Rpi-blb2 (Song et al. 2003).

Por otro lado los patógenos como se mencionó anteriormente (entre ellos *P. infestans*) producen sustancias encargadas de reprogramar, infectar y promover la enfermedad en las células que llegan a parasitar. A estas moléculas proteicas se las ha denominado efectores, los cuales se clasifican en:

1. Efectores apoplasmáticos: son secretados dentro del espacio extracelular de la planta, ahí interactúan con los objetivos extracelulares y los receptores de membrana.
2. Efectores citoplasmáticos: se translocan dentro de la célula vegetal, aparentemente por estructuras especializadas como vesículas de infección y haustorios (Kamoun 2006).

Los efectores pertenecen a la familia de proteínas RxLR (un tipo de efectores citoplasmáticos) que llevan consigo la región conservada RxLR (arginina, cualquier aminoácido, leucina, arginina). Usualmente se sugiere que esta región funciona como señal para mediar el paso de la proteína desde el haustorio hacia el interior de la célula vegetal (el mecanismo por el cual la proteína elicitora pasa del haustorio al citoplasma vegetal y a partir de ahí cómo esta encuentra sus blancos en la célula vegetal es aún un misterio). Las proteínas y genes *Avr* que provienen de oomicetos pertenecen en gran parte a la familia de proteínas efectoras RxLR. (Birch et al. 2006).

En general, los efectores comprenden a las toxinas (moléculas que causan muerte celular para facilitar la colonización del hospedero) y a los elicitors (moléculas que desencadenan una respuesta por parte del hospedero que resulta en la mejora de la resistencia al patógeno). Dentro del grupo de los elicitors se hallan las proteínas de avirulencia (*Avr*), identificadas en varios organismos tales como *H. parasitica* y varias clases de *Phytophthora* (Kamoun 2006).

Las proteínas *Avr* de los oomicetos poseen en el extremo N-terminal un péptido señal de secreción tipo II seguido de la región RxLR. Esta región está relacionado a la virulencia del patógeno y activa el dominio NB-LRR de las proteínas citosólicas R, desencadenando la respuesta de hipersensibilidad (Vleeshouwers et al. 2008). En el extremo C-terminal se encuentra una región conservada W que es requerida también para las funciones del efector y se ha demostrado que serían reconocidos por los genes RB, entre otros (Champouret et al. 2009).

El principal gen *Avr* de *P. infestans* que se ha estudiado a profundidad es el gen *Avr3a* teniendo como contraparte el gen *R3a* de *Solanum demissum*. Este gen de avirulencia posee dos alelos, uno virulento y el otro avirulento, que codifican dos proteínas con tan solo tres residuos diferentes, dos de los cuales están presentes en la proteína madura. El alelo dominante avirulento *Avr3a* codifica *AVR3A^{KI}* (C19, K80 y I103) y puede desencadenar la inmunidad en la planta al activar a la proteína de resistencia *R3a*. El alelo recesivo virulento *avr3a* codifica *AVR3a^{EM}* (S19, E80 y M103) 32,33 y está presente en las razas más patogénicas de *P. infestans*. Se diferencian en solo dos aminoácidos (Van Poppel et al. 2008).

Recientemente, se ha descrito la identificación de otros genes de avirulencia de *P. infestans* conocidos como ipiO (in planta-induced gene) que también están presentes en las especies *P. andina*, *P. ipomoeae*, *P. phaseoli* y *P. mirabilis*. La expresión de ipiO es inducido en la planta durante los primeros estadios del ciclo infeccioso de *P. infestans*. Todas las variantes de ipiO se han dividido en tres clases, las cuales se basaron en la diversidad de las secuencias aminoacídicas. La clase I (variantes IPI-O1 y IPI-O2) y clase II (variante IPI-O3) se encuentran en la mayoría de los aislamientos de *P. infestans*, son reconocidos por la proteína de resistencia RB de *S. bulbocastanum* (Rpi-blb1o RB), identificando al gen de avirulencia Avr-blb1 dentro de estas clases IPI-O. Sin embargo, la clase III (variante IPI-O4) no es reconocida por la proteína RB, lo que sugiere que aislamientos que contengan esta variante puede vencer la resistencia mediada por RB aun estando presente la variante IPI-O1. Todavía no está claro el mecanismo pero se cree que la variante IPI-O4 bloquea el reconocimiento de la variante IPI-O1 con la proteína RB evitando que se desencadene la RH (Halterman et al. 2010). El locus ipiO es extremadamente variable encontrándose la mayor cantidad de polimorfismos en la secuencia patrón W (Champouret et al. 2009) entre los aislamientos de *P. infestans*, no solamente en la presencia o ausencia de alelos específicos sino también en el número de copias (Halterman et al. 2010).

La mayoría de los genes de avirulencia (Avr) y resistencia (R) tienen un carácter dominante. En el concepto del “gen por gen”, la planta porta alelos dominantes (R) sobre los alelos de susceptibilidad (r), de igual modo el patógeno porta alelos de avirulencia (Avr) sobre los alelos de virulencia (avr). Las proteínas sintetizadas por los genes Avr, denominadas elicitores, pueden interactuar de manera directa con los productos de los genes *R* correspondientes, o de manera indirecta involucrando un tercer componente denominado blanco de virulencia (Bonas & Lahaye 2002).

Existen dos tipos de interacción entre la planta hospedera y el patógeno: incompatible y compatible. En la interacción incompatible el patógeno no logra infectar a la planta porque posee el alelo de avirulencia Avr, mientras que la planta posee el alelo de resistencia R. En cambio, en la interacción compatible, el patógeno logra infectar a la planta porque no posee ningún alelo de avirulencia

correspondiente a los alelos de resistencia de la planta o la planta no posee ningún alelo de resistencia R (Staskawics et al. 1995).

La interacción incompatible desencadena la resistencia a la enfermedad activando rápidamente una vía de señales de transducción denominada Respuesta de Hipersensibilidad (RH) (Birch et al. 2001). La RH se caracteriza principalmente por presentar una muerte celular programada en el mismo sitio de la infección en la planta, observándose una zona necrótica en la epidermis. Mientras que en la interacción compatible se desarrolla la enfermedad ante el ataque de un patógeno debido a que no se activa tempranamente la RH, permitiendo que las hifas se desarrollen y colonicen el tejido (Beyer et al. 2001).

2.3 Resistencia a *P. infestans*

Un número de especies silvestres de papa como *Solanum demissum* ($2n = 6x = 72$), coevolucionaron con *P. infestans* originando el primer germoplasma de papa con resistencia a tizón tardío en papas cultivadas a mediados del siglo XIX. Al menos 11 genes R (R1-R11) procedentes de *S. demissum* han sido incorporados en varios cultivares (Umaerus & Umaerus 1994). Todos estos genes confieren resistencia raza-específica al patógeno activando la respuesta hipersensible (RH) o muerte celular localizada. Esta resistencia raza-específica provee solo resistencia de vida corta en el campo siendo rápidamente vencido por nuevas razas virulentas de *P. infestans* (Wastie 1991). Por lo tanto, papas cultivadas que posean estos genes R de *S. demissum* no serían resistentes a todas las razas de *P. infestans*.

Se ha demostrado que el germoplasma de papa derivado de la especie silvestre diploide ($2n = 2x = 24$) *Solanum bulbocastanum* procedente de México posee una alta resistencia duradera y efectiva contra *P. infestans* en campo. Debido a que *S. bulbocastanum* al ser diploide es sexualmente incompatible con cultivares de papa de *Solanum tuberosum*, se desarrollaron híbridos somáticos mediante la fusión de protoplastos entre esta especie silvestre y cultivares de papa logrando obtener a largo plazo, mediante retrocruzamientos entre progenies, resistencia en papa muy similar a la resistencia que mostró el clon PT29 de *S. bulbocastanum*.

(Helgenson et al. 1998). Sin embargo, algunas veces el patógeno ha logrado esporular en cultivares de papa derivados del clon PT29. Este fenotipo que logra suprimir pero no eliminar los síntomas de la enfermedad han sido observados en pruebas de campo en EE.UU. y México entre los años de 1995 y 2002 por lo que la resistencia asociada a este material se denominó resistencia parcial siendo efectiva para el uso en programas de mejoramiento para resistencia a *P. infestans*. (Dorrance et al. 2001).

Posteriormente se descubrió que la resistencia que posee *S. bulbocastanum* está asociada a la presencia del gen Rpi-blb1 también denominado gen RB. Así mismo, se han encontrado en esta especie silvestre otros genes que confieren una resistencia duradera como es el caso del gen Rpi-blb2 y Rpi-blb3. Actualmente, hay un promedio de 21 genes que confieren diferentes especificidades de resistencia a este patógeno, ya sea como resistencia raza específica, o una resistencia de amplio espectro como es el caso del gen RB procedentes de diversas especies silvestres entre ellas *S. schenkii* (Rpi-snk1), *S. stoloniferum* (Rpi-sto1), *S. venturii* (Rpi-vnt1) (Douches et al. 2001).

2.4 Gen RB

El estudio del locus RB se realizó en el clon PT29 de *Solanum bulbocastanum*, encontrándose en el cromosoma VIII (Naess et al. 2001). Este locus presenta el carácter heterocigoto (RB/rb). Se hicieron mapas genéticos y bibliotecas genómicas en cromosomas artificiales de bacteria (BAC) y se encontró un grupo de genes funcionales y un gen truncado en el BAC CB3A14 que deriva del haplotipo RB. Los genes funcionales fueron cuatro genes R análogos (RGA) completos denominados RGA1, RGA2, RGA3 y RGA4 (Song et al. 2003).

Para clonar individualmente a estos genes RGA, se amplificaron mediante LR-PCR (PCR de amplio rango) con iniciadores específicos a los cuales se les añadió la secuencia del sitio de restricción *Bam*HI. Cada gen se clonó al vector binario pCLD04541 y luego se transformó con estos cuatro vectores el cultivar Katahdin de *Solanum tuberosum*, el cual es susceptible a *P. infestans*. Las plantas transformadas obtenidas con cada vector fueron infectadas con el aislamiento

mostró resistencia al patógeno desarrollando pequeñas lesiones en las hojas inferiores de la planta que fueron restringidas en el área infectada. Por lo tanto, se demostró que el gen RGA2 representa el gen funcional RB (Song et al. 2003).

Toda la secuencia donde se encuentra el gen RB que se clonó al vector pCLD04541 posee un tamaño de 8 559 pb donde está incluido también el promotor y el terminador. Solo el transcripto RB tiene un tamaño de 3 319 pb los cuales contienen dos secuencias UTR. La secuencia UTR 5' con 130 pb y la secuencia UTR 3' con 276 pb. El gen RB codifica una proteína de 970 aminoácidos con un peso molecular de 110.3 kDa, pertenece a la clase de proteínas R las cuales presentan dominios CC-NBS-LRR. En el extremo N terminal se encuentra el dominio CC (*coiled coil*) que es una secuencia repetida de 7 aminoácidos hidrofóbicos intercalados. La estructura CC consiste en dos o más hélices alfa que interaccionan para formar una estructura helicoidal y que podría estar implicada en interacciones proteína-proteína, incluso la formación de dímeros o trímeros, aunque también en la transducción de señales (Martin et al 2003).

El dominio NBS (nucleotide binding site) abarca diferentes secuencias: quinasa 1a (posición 182-190), quinasa 2 (posición 255-264) y quinasa 3 (posición 288-293), este dominio es altamente conservado en muchos genes R. Se cree que la función de unión a nucleótidos sería esencial para el funcionamiento de estas proteínas, sin embargo el papel que desarrolla en la activación de las defensas de la planta aún no está claro (Bent 1996). Finalmente el dominio LRR (*leucin rich repeat*) está constituido por 21 secuencias repetitivas ricas en leucinas y otros residuos hidrofóbicos posicionados de manera regular. Estos dominios están implicados en funciones de interacción con las proteínas efectoras del patógeno. A diferencia del gen RB, los otros genes RGA1, RGA3 y RGA4 tienen 22 dominios LRR lo cual significa que el número de estas repeticiones juegan un papel determinante en el reconocimiento específico de la proteína R (Song et al. 2003).

2.5 Proteínas presentes durante la resistencia a *P. infestans* mediada por el gen RB

Las plantas han adquirido con el tiempo ciertas habilidades para enfrentarse a varios estresores bióticos y abióticos en su ambiente natural, y estas dependen de la presencia de proteínas que están involucradas en la producción de fitohormonas como ácido jasmónico, etileno y ácido abscísico, proteínas relacionadas a la patogénesis, factores de transcripción y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Jonack et al. 2002).

Para tener un mayor conocimiento con respecto a las proteínas que se activan durante la resistencia mediada por el gen RB al tizón tardío de la papa, un grupo de investigadores utilizaron a *S. tuberosum* cultivar Katahdin que es susceptible a *P. infestans*, sin transformar como control negativo y transgénico con una sola copia del gen RB. Estas fueron sometidas a infección con *P. infestans* y mediante la técnica de electroforesis en gel de dos dimensiones (2-DE) y por espectrometría de masas, lograron aislar y caracterizar 12 proteínas acumuladas en tiempo 0 denominado también tiempo de pre infección, 24 y 72 horas post infección, con una diferencia significativa y relativa abundancia tanto en la planta resistente como en la susceptible (Liu & Halterman 2009). Solo cinco de estas proteínas fueron identificadas y tenían roles putativos en la fotosíntesis y en las respuestas frente al estrés tales como la ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa (denominada también RuBisCo) y la enzima ascorbato peroxidasa (APX) la cual juega un rol de protección contra el stress oxidativo. Esta última se encontró aumentada en la planta resistente luego de las 72 horas post infección sugiriendo que atenuaría la acumulación de las ROS presentes en la RH. También se encontró la enzima quinona oxidoreductasa (Qor) incrementada en la planta resistente en comparación con la susceptible, esta enzima cataliza la reducción de las quinonas protegiendo a las células contra las ROS. Generalmente la expresión del sistema de defensa por antioxidantes por parte de las plantas esta incrementada frente a respuestas bióticas o abióticas, de otra manera la producción de las ROS tendría efectos negativos sobre las funciones y metabolismos celulares. Encontraron también que mediante el silenciamiento de la proteína HSP90 en la planta, la proteína RB pierde la capacidad de inducir la RH luego de ser expuesta a

efectores IpiO de *P. infestans*. Esta proteína altamente conservada es una chaperona dependiente de ATP, tiene las funciones de estabilizar y facilitar el plegamiento de las proteínas, degradación de péptidos mal plegados y también es un regulador positivo de la acumulación de las proteínas NB-LRR, dominios pertenecientes al gen RB (Liu & Halterman 2009).

2.6 *Solanum tuberosum* variedad Desiree

Solanum tuberosum var. Desiree es producto de la selección a partir del cruce Urgenta x Depesche, realizado por la compañía ZPC de Leeuwarden, Holanda, y fue liberada para su producción comercial en 1962 (Hamester & Hils2003). Desiree es una variedad de ciclo medio tardío (90-120 días) con un desarrollo foliar vigoroso en el campo, que alcanza de 50 a 60 cm de altura. Produce flores de color violeta claro en abundancia media, estolones muy cortos y tubérculos ovalado-largos, de piel lisa y color rojo brillante los cuales presentan un período de dormancia (2,5-4 meses). La carne del tubérculo es color crema y los ojos son superficiales (NIVAP 2007).

Esta variedad posee una resistencia media al tizón tardío (*Phytophthora infestans*), alta a la pudrición seca (*Fusarium spp.*), y muy alta al pie negro (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) y a la sequía. También muestra una resistencia media a los nemátodos y de media a alta a los virus PVA, PVM, PVX y PVY. Ha mostrado una alta resistencia a la Sarna Común (*Streptomyces spp.*), la Roña (*Spongospora subterranea*) y a la Costra Negra o Rhizoctoniasis (*Rhizoctonia solani*). En la actualidad es una de las variedades de papa más cultivadas en Europa, América del Sur y Asia. Así mismo se adapta muy bien para consumo fresco (picadillo, puré, sopas) por su alta consistencia posterior a la cocción (Brenes & Gomez-Alpizar 2009).

2.7 Transformación genética de plantas

2.7.1. Sistema de *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium es una bacteria Gram negativa que habita en el suelo considerada una Alpha proteobacteria de la familia *Rhizobiaceae* (BACMAP: bacterial genome atlas 2008) y es usada exitosamente para transformación genética en numerosas plantas dicotiledóneas ocasionando tumores conocidos como “agallas” o “tumores del cuello” (Atkinson 2002) El método de infección de la bacteria se guía por las sustancias que la planta excreta de heridas pequeñas, por las que se introduce. La bacteria se ubica entonces en los espacios intercelulares y desde allí transfiere a las células de la planta un fragmento de su material genético, un plásmido para transferir ADN conocido como plásmido Ti (del inglés “Tumor inducing”), que contiene el ADN-T (ADN de transferencia), que se integra en el genoma de la planta (Douglas et al. 1985).

Este ADN-T contiene genes que provocan la producción de reguladores de crecimiento vegetal, de lo cual resulta el desarrollo del tumor. El ADN-T también contiene genes codificadores de enzimas que causan que la planta produzca aminoácidos especializados llamados opinas. Estos son una fuente de energía, específica para *A. tumefaciens*, pero no para otros organismos (Gelvin 2000). El análisis genético de diferentes plásmidos Ti (inductor de tumores), demostraron la existencia de dos elementos indispensables para la transferencia e integración de ADN-T en el genoma de plantas infectadas son: la región vir y las secuencias bordes del ADN-T (Tzfira & Citovsky 2002).

Los plásmidos Ti silvestres de *Agrobacterium* son capaces de transferir genes a las células vegetales que codifican la biosíntesis de hormonas. Obviamente las células que sintetizan altos niveles de auxinas y citoquininas no regeneran plantas completas (Klee et al. 1987). Esto ha llevado al desarrollo de plásmidos Ti desarmados que carecen de los genes que participan para la biosíntesis de fitohormonas que producen los tumores en plantas para ser sustituido por genes de interés. Como resultado, las células de plantas transformadas tienen morfogénesis normal y es posible regenerar plantas completas a través de cultivo

de tejidos. *Agrobacterium* tiene la capacidad de insertar una sola copia o pocas en comparación con la técnica de bombardeo de partículas.

En la transformación genética es necesario que la maquinaria del sistema de *A. tumefaciens* funcione correctamente así como también la célula vegetal reprima los genes de defensa (Veena et al. 2003). La ventaja es que con solo una copia de integración se tiene menor riesgo de inactivar genes esenciales (Srivastava et al. 1999). La eficiencia de transformación se ve influenciada no sólo por el genotipo de la planta, sino por la cepa de *A. tumefaciens*, el plásmido vector, los componentes que inducen los genes (*vir*), la composición de los medios (fuente de sacarosa) y los factores tejido específicos, así como la temperatura juega un papel importante en los eventos de transformación. En algunos casos la temperatura de 23-25°C permite un evento estable de transformación (Opabode 2006). Las concentraciones muy altas o bajas de *A. tumefaciens* pueden dañar las células de la planta ocasionando reducción en la frecuencia de transformación. Otro parámetro importante es el tiempo de inoculación y la adición de bactericida en el medio de selección (Zhao et al. 2000).

2.7.2 Vectores de clonación

Los vectores naturales de transformación vegetal son plásmidos de gran tamaño (aproximadamente 200 kb) provenientes de la bacteria *A. tumefaciens* y poseen dos componentes genéticos importantes: el ADN-T y la región de virulencia, codificada por el grupo de genes *vir*. El ADN-T contiene dos tipos de genes: (1) genes que se expresan eficientemente en la célula vegetal e inducen la síntesis de hormonas vegetales, denominados oncogenes, debido a que inducen la formación de tumores y (2) genes que sintetizan las hormonas opinas y octopinas. Esta región está delimitada por el borde derecho e izquierdo, con 25 pb cada uno. La región *vir*, de 35 kb, codifica un operón con 8 genes principales: *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF*, *virG* y *virH*. Estos genes actúan en conjunto para transferir el ADN-T de la bacteria al núcleo de la célula vegetal como ADN de una sola hebra (Sheng & Citovsky 1996).

El conocimiento sobre el mecanismo de transferencia del ADN-T ha permitido el desarrollo de vectores para la introducción de genes foráneos en plantas cultivadas. Existen dos tipos de vectores usados en la actualidad: vectores cointegrados y vectores binarios.

2.7.2.1 Vectores cointegrados

Estos vectores son contruidos por la recombinación entre un plásmido Ti desarmado que contiene el borde izquierdo del ADN-T, el grupo de operones *vir* y un origen de replicación en *A. tumefaciens*, y un segundo plásmido intermedio que contiene el gen de interés, un gen marcador de selección para células vegetales transformadas, otro gen marcador de selección que puede ser usado tanto en *E. coli* como en *A. tumefaciens*, el borde derecho del ADN-T, origen de replicación de *E. coli* y una región homóloga respecto a un segmento del plásmido Ti desarmado (figura 2). La recombinación se lleva a cabo por un evento de entrecruzamiento de regiones homólogas de los dos plásmidos. Una vez cointegrado, el plásmido es estable en *Agrobacterium* (Rogers et al. 1993). El problema en el uso de estos vectores es su gran tamaño, que dificulta su manipulación *in vitro*.

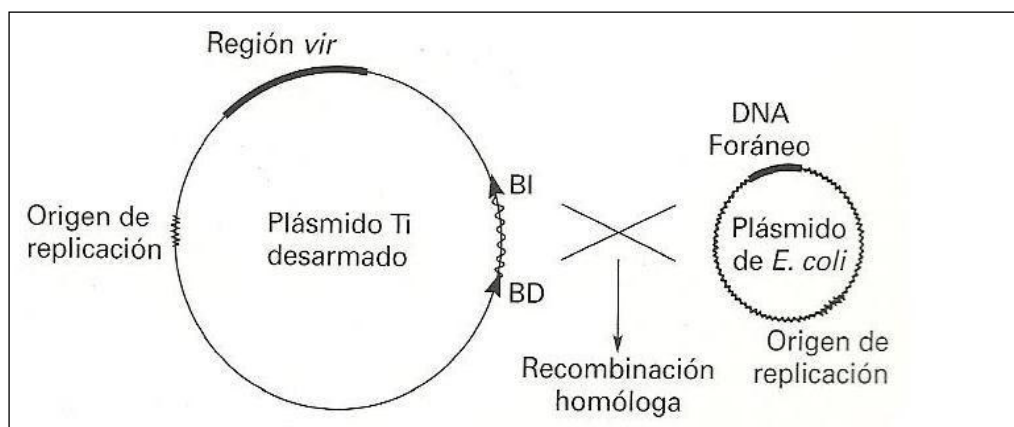


Figura 2. Vector cointegrado de transformación genética con *A. tumefaciens*. BD: borde derecho, BI: borde izquierdo. Fuente: Neyoy, 2012.

2.7.2.2 Vectores binarios

Estos son los vectores más usados en transformación de plantas y existe una gran variedad. El gran tamaño de los vectores Ti de 200 kb ha forzado el desarrollo

de nuevas estrategias como colocar los genes *vir* y el ADN-T en dos plásmidos separados (figura 3). En este sistema *Agrobacterium* tiene dos vectores:

- 1) Un plásmido Ti desarmado, llamado ayudante, de mayor tamaño, que se encuentra dentro de *A. tumefaciens* y que contiene la región *vir*. Esta región actúa en *trans* sobre el ADN-T (Bevan 1984).
- 2) Un plásmido binario que contiene el gen de interés y el gen marcador para células transformadas insertados entre los bordes derecho e izquierdo del ADN-T. Además, contiene al gen marcador de selección tanto para *E. coli* como para *A. tumefaciens* y los orígenes de replicación para ambas bacterias. Este vector es el más pequeño.

Los diferentes vectores binarios usados en la actualidad tienen la ventaja de poseer un tamaño pequeño (11 kb), que resulta manejable para una eficiente clonación de genes y transformación; un abundante número de sitios de restricción del ADN-T, lo que facilita la clonación; orígenes de replicación diseñados para obtener un alto número de copias y el gen de selección en bacterias y plantas (Hellens et al. 2000).

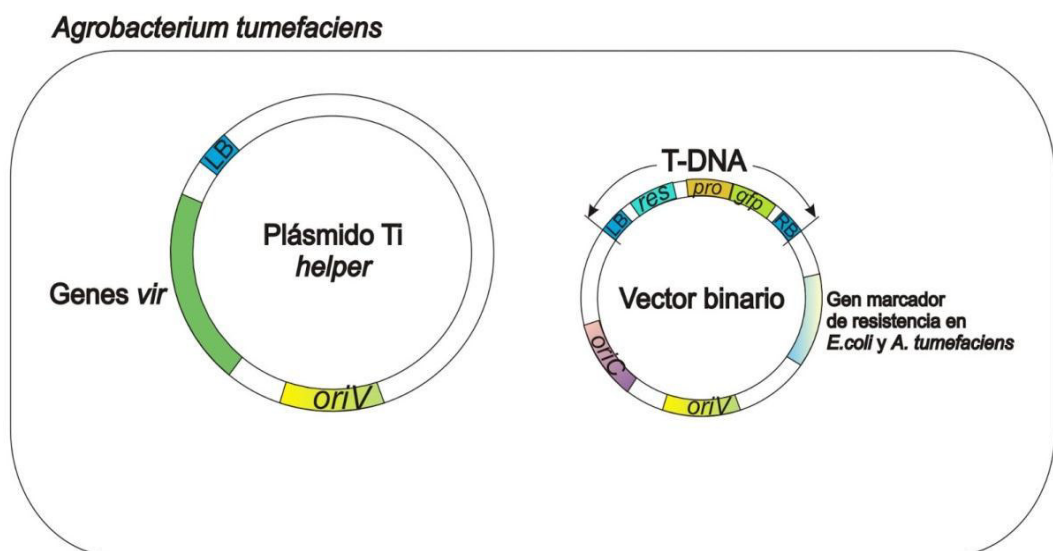


Figura 3. Vector binario de transformación genética con *A. tumefaciens*. LB: borde derecho, LB: borde izquierdo, *oriV*: origen en *A. tumefaciens*, *oriC*: origen en *E. coli*, *res*: gen de resistencia, *pro*: proteína de interés, *gfp*: proteína de fluorescencia verde (gen reportero-opcional). Fuente: Van Herper, 2010.

2.7.2.2.1 Vector pBIN20

Este vector binario contiene 18 sitios únicos de restricción (sitio de clonación múltiple, SCM), lo cual facilita la inserción de transgenes. Este SCM proviene del vector pSL301. El pBIN20 también contiene el gen de resistencia a kanamicina (*nptII*) entre los bordes del ADN-T (Hellens et al. 2000).

El progenitor plasmídico de pBIN20 es el vector pBI121, un derivado del pBIN19 (Hennegan & Danna 1998), que contiene el gen de la β -glucuronidasa (*gus*) bajo el control de promotor *CaMV35s* y el sitio de poliadenilación del gen de la nopalina sintasa (*nos*). Este vector ha sido utilizado en diversos trabajos de transformación genética en papa y camote, con resultados favorables (Kok-Jacon et al. 2007).

2.8 Genes marcadores de selección

La transformación genética con *A. tumefaciens* requiere de dos pasos importantes: i) selección y regeneración de tejidos transgénicos y ii) eliminación de *A. tumefaciens* EHA105. El proceso de selección depende de una correcta concentración de antibióticos en el medio de cultivo, y de que la superficie del explante debe estar en contacto con el medio de cultivo cuando ocurre lo contrario se da la presencia de escapes (Montserrat et al. 2001). Cuando la concentración de antibióticos no es la apropiada, se pueden producir escapes debido a un cierto grado de resistencia natural en las células vegetales (Jain 2001).

En el caso de la regeneración se suele utilizar el gen *nptII* para permitir una clara selección. Este gen, aislado del transposón procariota Tn5, codifica la neomicina fosfotransferasa (*nptII*) y confiere resistencia frente a antibióticos aminoglicósidos como kanamicina, gentamicina y neomicina (Montserrat et al. 2001). En nuestro caso los dos vectores binarios para transformación genética poseen el gen *nptII*. Este marcador de selección es uno de los más usados actualmente porque ha sido reconocido como inocuo para la salud humana

(Ramessar et al. 2007). La concentración mínima de antibiótico que inhibe la producción de escapes, debidos a cierta resistencia natural al antibiótico presente en el medio, es el utilizado para la preparación de medios de regeneración en transformación genética en plantas.

La proteína codificada por *nptII* es inocua para los humanos; esto se concluyó ya que no se encontró evidencia de alergias o toxicidad a la proteína. Las bacterias resistentes a la kanamicina son comunes en la naturaleza y muchas de estas son consumidas por los humanos cada día, principalmente en verduras frescas. Por lo tanto, el gen *nptII* ha sido usado extensivamente como marcador de selección en proyectos de transformación genética en diferentes organismos (Ghanem 2011).

2.9 Planteamiento del problema

A nivel mundial la papa está considerada dentro de los cuatro alimentos básicos junto con el trigo, el maíz y el arroz debido a su alto valor nutritivo, adecuado para las necesidades humanas (FAO 2010, MINAGRI 2012). Perú es uno de los principales productores de papa en Latinoamérica, con una producción promedio de 3.58 millones de toneladas y con un rendimiento promedio de 13.3 t/ha (MINAGRI 2012). Sin embargo, la producción de papa se ve afectada por la enfermedad del tizón tardío considerado como una amenaza para la seguridad alimentaria mundial, causando pérdidas económicas de hasta 6 mil millones de dólares anuales (Haas et al. 2009). El problema se agrava con la aparición de nuevas razas resistentes a los métodos de control debido al uso inadecuado de estos químicos como es el caso del metalaxyl y por ende a las variedades resistentes producidas por mejoramiento convencional que tardan varios años en ser producidas.

Por lo tanto, la mejor opción para el control del tizón tardío en papa de una manera rápida y eficaz sigue siendo el uso de la ingeniería genética para desarrollar nuevas variedades con resistencia a *P. infestans* a través de la transferencia directa de genes R con amplio espectro de resistencia, vía sistemas de transformación como el mediado por *Agrobacterium tumefaciens*.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La transformación genética de *Solanum tuberosum* var. Desiree con el gen RB de *Solanum bulbocastanum* producirán eventos transgénicos resistentes a *Phytophthora infestans*.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general

Obtener plantas transgénicas de papa de la variedad Desiree por la incorporación del gen RB vía *Agrobacterium tumefaciens* para conferir resistencia al aislamiento POX067 de *P. infestans* pertenecientes al linaje clonal EC-1.

3.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar mediante pruebas moleculares los eventos transgénicos obtenidos.
- Determinar el nivel de resistencia del gen RB en los eventos transgénicos.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Plántulas de papa *Solanum tuberosum* var. Desiree (código 800048) y el evento transgénico WIKD04 CIP que contiene el gen *nptII*, provenientes del Banco de Germoplasma del Centro Internacional de la Papa (figura 4). Ambos cultivados a condiciones de 20 a 22°C de temperatura, 16 horas de fotoperíodo, 3 000 lux de intensidad lumínica y a 60 a 70% de humedad relativa y fueron multiplicadas en magentas con medio semisólido MSA por un tiempo de 3 semanas (Anexo 10.4).



Figura 4. Plántulas de papa *Solanum tuberosum* L var. Desiree cultivadas *in vitro*.

4.2 Material bacteriano

El material bacteriano que se usó pertenece a la colección de bacterias del Área de Biotecnología Aplicada del Centro Internacional de la Papa.

Tabla 1. Características de las bacterias utilizadas para transformación genética.

Bacteria	Cepa	Nombre plásmido	Código	Objetivo
<i>E. coli</i>	Dh5α	pCIP68	EC170	Síntesis de sonda. Control positivo para prueba de PCR.
<i>A. tumefaciens</i>	EHA105	pCIP68	AT0115	Transformación genética

Ambas bacterias poseen el plásmido binario pCIP68 el cual conlleva el gen RB de *S. bulbocastanum*. El ADN de transferencia de este vector posee la secuencia codificante, promotora y terminadora del gen RB (accesión GenBank AY336128.1) y la secuencia codificante del gen neomicina fosfotransferasa II (nptII) como marcador de selección bajo la regulación de la secuencia promotora y terminadora del gen nopalina sintasa de *A. tumefaciens* (P-Nos y T-Nos). Las bacterias fueron cultivadas en placas Petri de poliestireno de 100 x 15 mm con medio semisólido LB (Anexo 10.1) conteniendo el agente selector, el antibiótico kanamicina a 100 mg/L (Sigma, St. Louis, MO). Las placas fueron incubadas a 28°C por 48 horas en caso de *A. tumefaciens* y a 37 °C por 24 horas en caso *E. coli*.

4.3 Aislamiento del patógeno

El aislamiento POX067 de *P. infestans*, perteneciente al linaje clonal EC-1 con tipo de apareamiento A1 fue aislado de la variedad susceptible Amarilis en el área de Oxapampa, departamento de Pasco, Perú en el año 2000 (Villamón et al. 2005), (Perez et al. 2001). La concentración utilizada en cada inoculación fue de 3000 esporangios/mL.

4.4 Transformación genética de *S. tuberosum* var. Desiree

Se utilizó el método de Medina-Bolívar & Cramer (2004) el cual se caracteriza por ser directo, rápido y eficiente. Consiste en cortar la hoja con peciolo y/o entrenudos de la variedad Desiree de 3 semanas de edad con un bisturí SMIC N°10 que contenga *A. tumefaciens* cepa EHA105 código AT0115 la cual posee el vector pCIP68 y fue co-cultivado por 24 horas en placas Petri de poliestireno de 100 x 15 mm con medio MS (Anexo 10.4) rico en sacarosa y sales Murashige bajo condiciones de oscuridad y 20 a 22°C de temperatura (figura 5).

4.4.1 Selección y regeneración de los explantes transformados

Después del co-cultivo se retiraron los explantes del medio MS y se transfirieron a placas Petri conteniendo el medio de regeneración denominado Willmitzer (Anexo 10.4) que contiene fitohormonas como auxina, giberelina, citoquinina y el agente selector kanamicina a 100 mg/L.

Se colocaron de 6 a 10 entrenudos en cada placa Petri con el medio de regeneración. El antibiótico carbenicilina también estuvo presente en el medio Willmitzer a una concentración de 250 mg/L para controlar el crecimiento remanente de *A. tumefaciens*. El medio fue renovado cada dos semanas.

4.4.2 Cosecha y propagación de los posibles eventos transgénicos

Pasado las cinco semanas se cosecharon los regenerantes que brotaron en las zonas donde se produjo el corte en los explantes transformados y se transfirieron a tubos que contenían medio MSA con carbenicilina a 250 mg/L para eliminar el crecimiento remanente de *A. tumefaciens*. Luego de 3 semanas se multiplicó nuevamente el material con la finalidad de evaluar el gen RB y *nptII*. A cada regenerante cosechado de cada explante transformando se le consideró como posible evento transgénico.

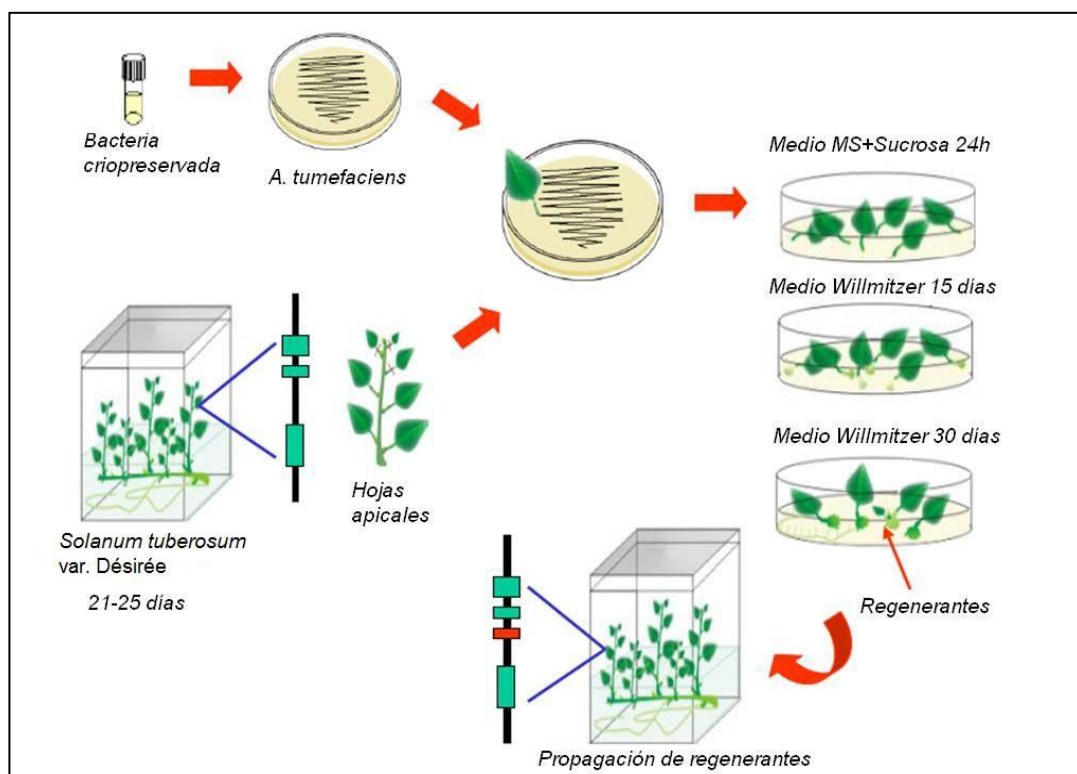


Figura 5. Esquema de la metodología de transformación genética utilizada en el presente trabajo. Serna, 2011.

4.5 Prueba de resistencia a kanamicina

Esta prueba se usó para evaluar de manera preliminar si los regenerantes cosechados fueron transformados y eliminar posibles escapes. Se pudo evaluar de manera indirecta la expresión del gen *nptII*. Se procedió del siguiente modo:

- Se preparó dos grupos de placa Petri conteniendo el medio 303 (Anexo 10.4), un grupo de le adicionó el antibiótico kanamicina a 200 mg/L y el otro grupo sin el antibiótico.
- Se cortó segmentos de hojas del tercio superior de los posibles eventos transgénicos y no transgénico para usarla como control negativo y hojas del evento transgénico WIKD04 CIP que tiene incorporado el gen marcador *nptII*, como control positivo.
- Los segmentos de las hojas fueron colocados de tal manera que el envés esté sobre el medio 303 y se dejó incubar por cuatro semanas a las siguientes

condiciones: 20 a 22°C de temperatura, 16 horas de fotoperíodo, 3 000 lux de intensidad lumínica y a 60 a 70% de humedad relativa.

- Pasado las cuatro semanas, se evaluó la formación de callo solo en la zona de corte del segmento de la hoja considerándose positiva. De esta manera se determinó preliminarmente los eventos transformados según esta prueba.

4.6 Análisis moleculares: prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la identificación y caracterización de los eventos que presenten el gen RB y el gen *nptII* se realizaron las pruebas moleculares de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

4.6.1 Extracción de ADN a pequeña escala

- Se cortó dos hojas de plántulas de un mes de crecimiento y se colocó en microtubos de 1.5 ml. Se colocó una perlitita de cerámica autoclavada por microtubo y se añadió 700 µl de tampón CTAB 2X (Anexo 10.5) y 2 µl de 2-mercaptoetanol.
- Estos microtubos fueron colocados en un triturador Savant Fast Preps por 20 segundos a una velocidad de 4 m/s.
- Luego se retiró estas muestras del triturador y se incubó en baño maría a 65°C por 30 minutos, agitando los microtubos cada 10 minutos. Pasado el tiempo se retiró los microtubos y se mantuvo a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Se adicionó 900 µl de cloroformo: alcohol isoamílico a una proporción de 24:1 y se mezcló suavemente por inversión. Luego se centrifugó a 14 rpm por 5 minutos.
- Se transfirió el sobrenadante a un microtubo limpio de 1.5 ml usando tips con boca ancha y se adicionó 0.6 volúmenes de isopropanol frío, mezclándolo suavemente y dejándolo incubar a -20°C por 20 minutos para que precipite el ADN. Luego se centrifugo a 14 000 rpm por 20 minutos.

- Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el ADN precipitado mediante inversión de los microtubos sobre papel absorbente por 15 minutos.
- Se lavó el ADN precipitado adicionándole 1 ml de alcohol al 95% y se centrifugó a 14 000 rpm por 5 minutos.
- Se descartó el etanol y se procedió nuevamente a secar el ADN precipitado descrito anteriormente. Ya seco el ADN, se resuspendió en 80 µl de agua DEPC (Anexo 10.3).
- Se adicionó finalmente 1.5 µl de RNAsa y se dejó incubando a 37°C por 1 hora. Se almacenó a -20°C hasta su uso.
- Se verificó que la calidad del ADN extraído este en adecuadas condiciones. Se corrió 1 µl de las muestras con 9 µl del tampón de carga SALB 1X con Gelred (Anexo 10.3) en un gel de agarosa con tampón TBE al 1% (Anexo 10.3) y se corrió a 70 V por 30 minutos. Se verificó el estado del ADN y se almacenó a -20°C hasta su uso. Verificada la calidad de ADN se procedió a realizar las pruebas de PCR.

4.6.2 Reacción de la PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es una reacción enzimática *in vitro*, se aprovecha en usar la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene capacidad de sintetizar naturalmente el ADN. Los elementos usados son el templado o molde (ADN), la enzima conocida como *Taq* polimerasa, los iniciadores que son oligonucleótidos (sentido y antisentido) que amplifiquen el gen RB y el gen nptII (Tabla 2, figura 6), los desoxirribonucleotidos (dNTPS), una solución de tampón con cloruro de magnesio y agua libre de nucleasas (Tabla 3). La síntesis del ADN se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión. En nuestro caso se usó para amplificar el gen RB y nptII en muestras de ADN de plantas transformadas.

Tabla 2. Iniciadores utilizados en la prueba de la PCR para la detección del gen RB y *nptII*.

Gen	Iniciador	Orientación	Secuencia	Amplícón
RB	RGA-B	Sentido	5'-TCCTGTTTGATGGTGGTTCCGA-3'	299 pb
		Antisentido	5'-CTTCCCTTCCTTTCTCGCCA-3'	
<i>nptII</i>	Km-1	Sentido	5'-ACGATTCCGAAGCCCAACC-3'	597 pb
		Antisentido	5'-TCCTGTCATCTCACCTTGCTCC-3'	

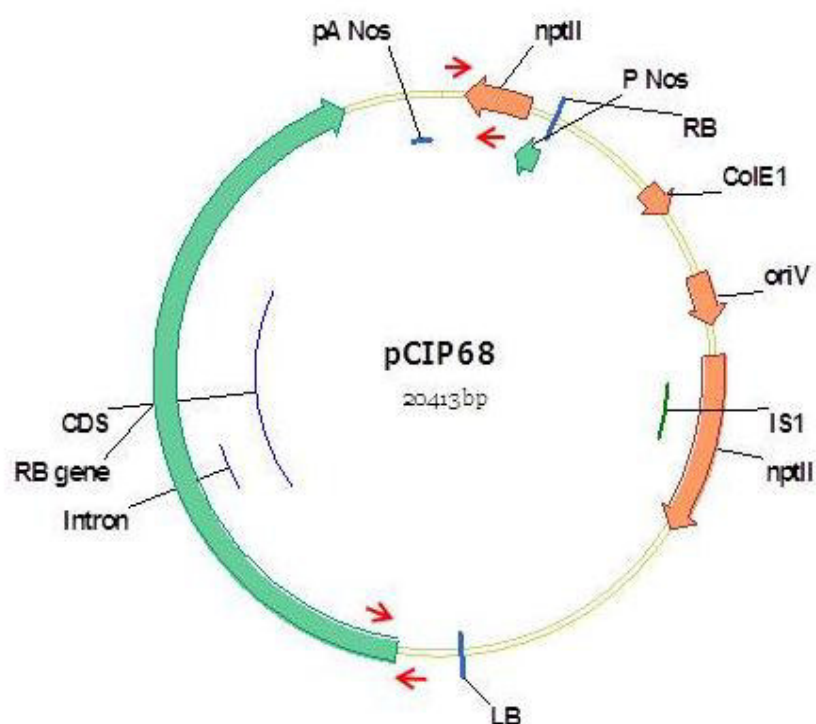


Figura 6. Vector binario pCIP68. LB, borde izquierdo; gen RB; intrón del gen RB con un tamaño de 679 pb; CDS, secuencia codificante del gen RB con un tamaño de 3,589 pb; pA Nos, secuencia de poliadenilación de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens*; *nptII*, gen neomicina fosfotransferasa; P Nos, promotor de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens*; RB, borde derecho; ColE1, sitio de replicación de *E. coli*; *oriV*, sitio de replicación de *A. tumefaciens*; IS1, secuencia de inserción. Flechas rojas indican posición de los cebadores para cada gen *nptII* y RB.

Tabla 3. Componentes usados para prueba de PCR

Componentes	Concentración del Stock	Concentración final	volumen
Agua			10.6 µl
Tampón de PCR 10X		1.5 mM	1.5 µl
Mezcla dNTPs	10 mM cada uno	0.2 mM cada uno	0.3 µl
Iniciador sentido	5 µM	0.1 µM	0.75 µl
Iniciador antisentido	5 µM	0.1 µM	0.75 µl
<i>Taq</i> (NEB)*	5 U/ µl	0.0075 U	0.0375 µl
ADN molde		50 ng	1 µl
Volúmen final			15 µl

* *Taq* polimerasa de New England BioLabs®

4.6.3 Condiciones de amplificación de la PCR

Las condiciones usadas para la síntesis o amplificación del ADN varían según el tamaño del amplicón y del fabricante de la enzima. En nuestro caso se siguió el procedimiento de New England BioLabs® que se detalla en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones usadas para la amplificación del ADN

	Pasos	Temperatura °C	Tiempo en minutos
Desnaturalización inicial		94	3
35 ciclos	desnaturalización	94	1
	hibridación	55	1
	extensión	72	1
Extensión final		72	10
		4	α

Las plantas transformadas confirmadas por las pruebas de resistencia a kanamicina y por la prueba de PCR se denominaron eventos transgénicos con su código correspondiente, variedad: Desiree, gen: RB y el número del regenerante cosechado en orden correlativo. Ej.: Desiree [RB]X.

4.7 Trasplante del material bajo condiciones de invernadero

Los eventos transgénicos y testigos o plantas controles fueron aclimatados a condiciones de invernadero en el Laboratorio de Bioseguridad del Centro Internacional de la Papa. Se trasplantaron 12 plántulas propagadas in vitro por evento y se colocaron en pequeños discos de sustrato conocido como Jiffy-7[®] (Jiffy Products International BV) por 15 días o hasta que enraizaron. Luego, los Jiffy-7[®] fueron trasplantados a macetas de plástico con el sustrato de cultivo PRO-MIX[®] (Premier Tech Horticulture), obteniendo 4 macetas por evento transgénico. El riego fue semanal directo al sustrato. Pasados 4 meses se cosecharon los tuberculillos de estas plantas pertenecientes a la primera generación vegetativa. Del mismo modo descrito anteriormente, se sembraron 12 tuberculillos uniformes repartidos en 4 macetas por cada evento, generando plantas de segunda generación vegetativa (F2).

4.8 Prueba de infección en planta entera con *P. infestans*

La prueba de infección se realizó a los eventos que fueron positivas para la prueba de kanamicina y la prueba de PCR. Se llevó a cabo en los cubículos de bioseguridad del CIP a condiciones controladas de temperatura 17-18°C y 100% de humedad con la finalidad de promover el desarrollo de la enfermedad. (Dorrance & Inglis 1997), (Pérez 2000).

Se utilizaron plantas de F2 propagadas vegetativamente de 6 semanas de edad, las que fueron inoculadas (aislamiento POX067) en el envés de los folíolos con 3000 esporangios/mL de *P. infestans* y colocadas dentro de una bolsa plástica para generar un ambiente extremo. El aislamiento POX067 (4 repeticiones cada evento) pertenece al genotipo EC-1, tipo de apareamiento A1, aislado en la ciudad de Oxapampa Perú. Se tomó muestras al azar de hojas de toda la planta de solo 2 repeticiones de cada evento (A y B) para el análisis de expresión del gen RB. Así mismo, se consideraron en esta prueba como control negativo a una planta de *S. tuberosum* var. Desiree sin transformar, la variedad Yungay y un control positivo el clon LBR40. Las tomas de las muestras se realizaron un día antes de la infección

(pi), primer día pos infección (1 dpi), tercer día pos infección (3 dpi) y quinto día pos infección (5 dpi). Las lecturas se realizaron al quinto día después de la infección por inspección visual y la evaluación consistió en el porcentaje del área del tejido dañado o necrosado en la planta. Luego estos datos fueron ajustados a la escala de Malcolmson (anexo 10.6) donde el valor de 1 sería una planta altamente susceptible y el valor de 9 sería una planta altamente resistente. A continuación la descripción de la escala de Malcolmson (Cruickshank et al. 1982):

- 1 = > 90%
- 2 = 81 - 90%
- 3 = 71 - 90%
- 4 = 61 - 70%
- 5 = 41 - 60%
- 6 = 26 - 40%
- 7 = 11 - 25%
- 8 = 1 - 10%
- 9 = 0%

4.9 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se tomó en cuenta el uso del diseño completamente al azar como la Prueba de Kruskal Wallis debido a las características no paramétricas que presentaron los datos. Esta prueba es apropiada para comparar más de dos grupos independientes de rangos (medianas) y determinar que la diferencia no sea producto del azar sino que sea estadísticamente significativa.

Se utilizó el programa R, librería Agricolae (De Mendiburu 2009) de libre disponibilidad en *online*: <http://www.r-project.org/>.

4.10 Nivel de expresión del gen RB mediante RT-qPCR

Se hicieron las extracciones de ARN para la posterior síntesis de ADN complementario (ADNc) de cada una los eventos que mostraron resistencia a *P. infestans* con el aislamiento POX067 (figura 7). Las muestras fueron molidas con

nitrógeno líquido y repartidas en microtubos de 2 ml. Todo esto se llevó a cabo en condiciones estériles y libres de nucleasas. Luego se procedió a la extracción de ARN.

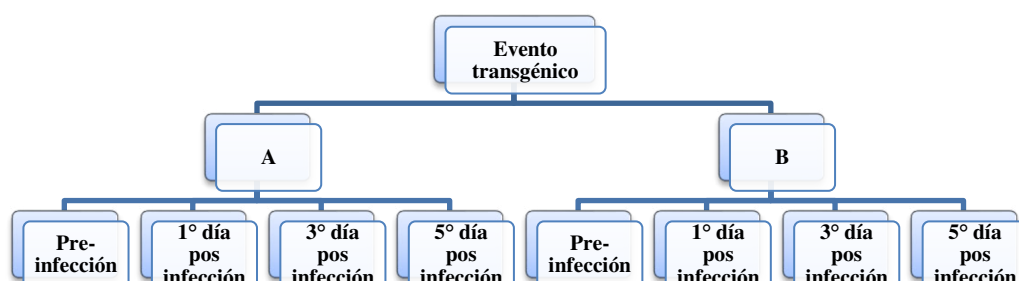


Figura 7. Esquema de la metodología que se utilizó para muestrear y extraer el ARN de los eventos transgénicos que fueron infectados con *P. infestans* para su posterior.

4.10.1 Extracción de ARN- Protocolo TRIzol® (Invitrogen)

- Se adicionó 1 ml de TRIzol® a cada microtubo de 2 ml con tejido molido de hojas y se dejó incubar en hielo por 5 minutos.
- Se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a otro microtubo limpio de 1.5 ml.
- Se adicionó 400 µl de cloroformo al sobrenadante y se agitó suavemente por 5 minutos en hielo para luego ser centrifugado a 12 000 rpm por 15 minutos a 4°C.
- Luego se transfirió la fase acuosa o sobrenadante a otro microtubo con 750 µl de isopropanol frío. Se mantuvo en incubación por 30 minutos a -20°C.
- Se centrifugó a 12 000 rpm por 20 minutos a 4°C descartándose con cuidado el sobrenadante y se adicionó 1 ml de etanol al 75% (diluído con agua DEPC).
- Nuevamente se centrifugó a 12 000 rpm por 15 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante.
- Se dejó secar el ARN precipitado por 30 minutos sobre hielo y finalmente se resuspendió en 100 µl con agua DEPC.

- Se verificó la calidad del ARN preparando un gel de agarosa al 2% con tampón TBE 1X.
- Se corrió 2 µl de muestra de ARN más 2 µl del tampón de carga que está compuesto por 1.74 µl de formamida y 0.26 µl de gelred (1:4).
- Verificada la calidad de las muestras de ARN se procedió a digerirlas con DNAsa (Promega®). Para este procedimiento se hecho 3 µl de la enzima RQ1 RNase-free DNase, 12 µl del tampón de la DNAsa, 5 µl de agua DEPC en cada tubo de muestra de ARN llegando a un volumen final de 120 µl y se dejó incubar a 37°C por 15 minutos.
- Finalizada la reacción se purificó el ARN agregándole 1 volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico en una proporción de 25:24:1. Se agitó suavemente por un minuto y se centrifugó a 12 000 rpm a 4°C por 2 minutos.
- Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio y se le adicionó 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico a una proporción de 24:1 centrifugándolo también a 12 000 rpm por 2 minutos a 4°C.
- Se transfirió nuevamente la fase acuosa a otro microtubo limpio y se le adicionó 0.1 volumen de acetato de sodio a 3M pH: 5.2 y 2.5 volúmenes de isopropanol frío mezclándolo por inversión y se dejó incubar sobre hielo por 5 minutos.
- Posteriormente se centrifugó a 12 000 rpm por 10 minutos a 4°C. Cuidadosamente se aspiró todo el sobrenadante y se lavó el ARN precipitado con 1 ml de etanol al 70% (diluido con agua DEPC) centrifugándose por 5 minutos a 4°C. Se dejó secar el pellet sobre hielo por 30 minutos y se resuspendió en 50 µl de agua DEPC. Se almacenó a -70°C hasta su uso.

4.10.2 Síntesis de ADNc

Se siguió el protocolo de Invitrogen®: Superscript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR. Este protocolo divide en 3 pasos la reacción de síntesis de ADNc

- Primer paso:

Se utilizó 2 µg de ARN de cada muestra el cual se ajustó en un volumen de 8 µl. Los componentes utilizados por muestra fueron:

Componentes	Volumen
ARN (2 µg)	8 µl
Iniciadores hexámeros al azar	1 µl
Mezcla de dNTPS (10 mM)	1 µl
	10 µl

Se incubaron los microtubos a 65°C por 5 minutos y luego se dejó reposar en hielo por un minuto.

- Segundo paso:

Se realizó la mezcla para la síntesis de ADNc, utilizando los siguientes componentes:

Componentes	Vol. para una Reacción
10X RT-tampón	2 µl
25 mM de MgCl ₂	4 µl
0.1 M de DTT	2 µl
RnasaOUT™ (40 U/ µl)	1 µl
SuperScript™ III RT (200 U/ µl)	1 µl
Volumen total	10 µl

Se adicionó 10 µl de la mezcla para la síntesis de ADNc a cada microtubo de reacción del primer paso y se centrifugó rápidamente. Se llevó a incubar a 25°C por 10 minutos luego a 50°C por 50 minutos y finalmente a 85°C por 5 minutos. Se mantuvo las reacciones en hielo.

- Tercer paso:

Se adicionó 1 µl de la enzima RNasa H a cada microtubo, se centrifugó brevemente y se incubó a 37°C por 20 minutos. Así se obtuvo el ADNc el cual fue almacenado a -20°C hasta su uso.

Las muestras obtenidas fueron usadas como ADN templado para realizar el análisis de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-qPCR), que permitirá cuantificar la expresión del gen RB. Así también, se usó como normalizador de los niveles de expresión del gen RB, el gen endógeno factor de elongación 1 α (ef1 α). Para ambos genes se usaron los siguientes iniciadores específicos detallados en la tabla 5.

Tabla 5. Iniciadores usados para la prueba de RT-qPCR

Iniciador	Orientación	Secuencia	Tamaño del amplicón
RB* (Figura 11)	Sentido	5'- CACGAGTGCCCTTTTCTGAC-3'	214 pb
	Antisentido	5'- ACAATTGAATTTTCTAGACTT-3'	
ef1 α **	Sentido	5'-ATTGGAAACGGATATGCTCCA- 3'	101 pb
	Antisentido	5'-TCCTTACCTGAACGCCTGTCA-3'	

(Colton et al. 2006)*, (Nicot et al. 2005) **

4.10.3 Eficiencias de la PCR de los genes RB y ef1 α utilizados en la prueba de RT-qPCR

Sintetizados los ADNc de los eventos de interés y del control, se tomó 1 μ L de cada uno mezclándolos en una misma reacción para obtener una mezcla madre. Se realizó 5 diluciones seriadas de esta mezcla: 100 ng, 50 ng, 25 ng, 12.5 ng y 6.25 ng. La eficiencia de la PCR por cada gen se determinó a partir de la pendiente de la curva estándar la cual es determinada por el promedio de los valores Cq y los valores logarítmicos de cada concentración de ADNc. Se utilizó la siguiente fórmula para hallar la eficiencia de la PCR (Pfaffl 2004):

$$E=10^{(-1/\text{pendiente})}-1$$

4.10.3.1 Reacción de la RT-qPCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real puede cuantificar pequeñas cantidades de secuencias específicas de ácidos nucleicos. Es una prueba rápida y precisa que permite la valoración de cambios en la expresión de genes. Ésta tecnología está basada en la detección de una señal fluorescente

producida proporcionalmente durante la amplificación del ADN blanco. Los componentes usados para prueba de RT-qPCR se detallan en la tabla 6.

Tabla 6. Componentes usados para prueba de PCR

Componentes	Concentración del Stock	Volumen
Agua		3 µl
SYBR Green*		5 µl
Iniciador sentido	5 µM	0.5 µl
Iniciador antisentido	5 µM	0.5 µl
ADNc molde**		1 µl
Volúmen final		10 µl

*Se usó el kit Power SYBR Green Master Mix de Applied Biosystems.

** 1 µl de cada dilución seriada

4.10.3.2 Condiciones de amplificación de la RT-qPCR

La descripción del programa de amplificación de la RT-qPCR se detallada en la tabla 7.

Tabla 7. Programa de RT-qPCR utilizando el termociclador Applied Biosystems StepOne™

	Pasos	Temperatura °C	Tiempo
Activación de la enzima		95	10 min.
40 ciclos	{ denaturación	94	10 seg.
	{ hibridación	55	30 seg
	{ extensión	60	1 min.
Temperatura de fusión	{	95	15 seg.
		60	1 min.
		95	15 seg

4.10.4 Amplificación y cuantificación relativa del gen RB

Determinada las eficiencias de PCR para cada gen, se procedió a amplificar cada muestra biológica de cada evento transgénico (A y B) por triplicado denominado replicas técnicas. Se utilizó la misma receta para la reacción de la RT-qPCR y condiciones de amplificación nombradas en el párrafo anterior.

Obtenidos los valores de Cq de cada muestra, tanto para los genes RB y ef1 α se utilizó el programa REST 2009 “Relative Expression Software Tool” de Qiagen para obtener la expresión relativa del gen RB normalizado por el gen ef1 α de cada evento transgénico. El programa REST 2009 se basa en el método de Pfaffl et al. (2001) para la cuantificación relativa de un gen diana versus un gen de referencia:

$$\text{Expresión Relativa} = \frac{E_{\text{diana}}^{\Delta\text{CP diana (control - muestra)}}}{E_{\text{referencia}}^{\Delta\text{CP ref (control - muestra)}}$$

- E_{diana} = eficiencia del gen diana
- $E_{\text{referencia}}$ = eficiencia del gen de referencia
- $\Delta\text{CP diana (control - muestra)}$ = cambio en los valores de los ciclos umbral (CP = Cq) del gen diana entre la muestra calibradora (control) y la muestra referencia o experimental (muestra)
- $\Delta\text{CP ref (control - muestra)}$ = cambio en los valores de los ciclos umbral (CP = Cq) del control endógeno entre la muestra calibradora (control) y la muestra referencia o experimental (muestra).

4.10.5 Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples como parte de la prueba de ANOVA de dos vías. Para confirmar la existencia de diferencias significativas se compara las medias de todos los tratamientos contra un control, el cual a la vez, se considera como un tratamiento. El programa estadístico usado fue el GraphPad Prism 6.

4.11 Prueba de Southern blot

Una vez obtenidas los eventos resistentes se procedió a determinar el número de copias del inserto del ADN-T donde se encuentra el gen RB y el gen nptII por Southern Blot. Se extrajo el ADN genómico a mediana escala de los eventos transgénicos, de acuerdo al protocolo de extracción de ADN vegetal a mediana

escala descrito por Ñopo et al. (2005). Posteriormente, el ADN fue digerido por la enzima de restricción *EcoRI* y se utilizó como sonda la secuencia amplificada del gen *nptII* por los iniciadores km-1 para determinar el número de copias del ADN-T donde está el gen de interés presente en cada evento transgénico (Figura 8).

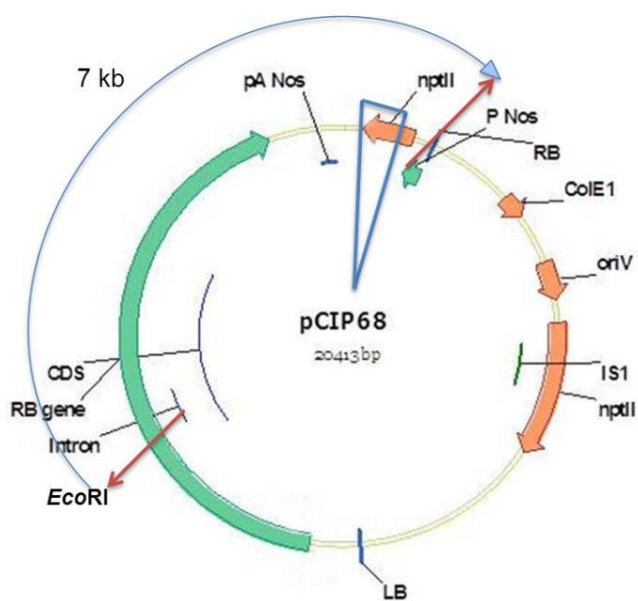


Figura 8. Mapa físico del vector pCIP68 mostrando la sonda y el sitio de restricción con la enzima *EcoRI* utilizados en la prueba de Southern blot. La flecha anaranjada indica el tamaño de 7 kb desde el sitio de restricción *EcoRI* hasta el RB (right border) Fuente: programa Vector NTI 11.

4.11.1 Extracción de ADN vegetal a mediana escala

- Se agregó 20 ml de tampón de extracción CTAB y 200 µl de 2-mercaptoetanol a un tubo de 50 ml. Se molió aproximadamente 6 g de tejido vegetal de los eventos resistentes con nitrógeno líquido y se transfirió a los tubos preparados anteriormente.
- Se incubaron los tubos a 65°C por 20 minutos y luego se dejó a temperatura ambiente por 10 minutos.
- Se agregó 20 ml de cloroformo: alcohol isoamílico a una proporción de 24:1 y se mezcló suavemente por inversión 5 minutos. Se procedió a centrifugar a 6 000 rpm por 15 minutos. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo de 50 ml. Se repitió este paso dos veces.
- Posteriormente se adicionó 15 ml de isopropanol frío a cada tubo, mezclándose bien por inversión y dejándolo incubar a -20°C por 1 hora. Pasado este tiempo se centrifugó a 5 000 rpm por 20 minutos a 4°C.
- Se transfirió el ADN precipitado a un microtubo de 1.5 ml y se procedió a lavar con 800 µl de la solución de lavado #1 (Anexo 10.5) a temperatura ambiente por 10 minutos. Nuevamente se transfirió el ADN precipitado y se adicionó 800 µl de la solución de lavado #2 (Anexo 10.5) a temperatura ambiente por un minuto.
- Finalmente se transfirió por última vez el ADN precipitado a un microtubo 1.5 ml agregándole 300 µl de agua DEPC y 5 µl de RNAsa dejándolo incubar a 37°C por 1 hora.
- Se corrió 1 µl de las muestras con 9 µl del tampón de carga SALB 1X en un gel de agarosa con tampón TBE al 1% y se corrió a 70 voltios por 30 minutos. Se verificó el estado del ADN y se almacenó a -20°C hasta su uso.

4.11.2 Digestión del ADN vegetal

Después de haber extraído y purificado el ADN de las muestras, se preparó las digestiones con la enzima *EcoRI* la cual corta una sola vez el vector pCIP68 y no corta el gen nptII de donde se sintetizó la sonda. La digestión se realizó según el siguiente esquema de la tabla 8:

Tabla 8. Compuestos empleados en la digestión genómica del ADN

Componentes	Volumen	Concentración Final
Agua	X μ l	-
ADN	X μ l	30 μ g
Tampón de la enzima 10X	25 μ l	1X
Enzima (10 U/ μ l)	1 μ l	10 U
Volumen total	250 μ l	

Las digestiones se incubaron a 37°C por toda la noche y se corrió una alícuota de 5 μ l en un gel de agarosa al 1% con tampón TBE 1X. Seguidamente se precipitó el ADN digerido en cada tubo adicionando 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol al 95%.

Se incubó a -20°C por 30 minutos y luego se centrifugó a 14 000 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el ADN precipitado. Al final se resuspendió en 80 μ l de agua DEPC. Se almacenó a -20°C hasta su uso.

4.11.3 Preparación de la sonda

La sonda fue sintetizada usando el kit de Roche PCR DIG Probe Synthesis. Se utilizó los iniciadores km-1 (tabla 2) y el vector pCIP68 (figura 5) como ADN molde. Se siguió los pasos descritos por el fabricante. Elementos empleados para la preparación de la mezcla maestra para la síntesis de la sonda, descritos en la tabla 9 y las condiciones del PCR descritos en la tabla 10.

Tabla 9. Compuestos para la preparación de la sonda

componentes	Sonda+DIG	Control negativo no marcado
Agua	14.75 μ l	14.75 μ l
Tampón de PCR	2.5 μ l	2.5 μ l
DIG PCR	1.25 μ l	-
Stock dNTPS	-	1.25 μ l
Iniciador sentido (10 μ M)	2.5 μ l	2.5 μ l
Iniciador antisentido (10 μ M)	2.5 μ l	2.5 μ l
Taq	0.5 μ l	0.5 μ l
ADN	1 μ l	1 μ l
Volumen total	25 μ l	25 μ l

Tabla 10. Condiciones del programa de PCR

	Pasos	Temperatura °C	Tiempo en minutos
Desnaturalización inicial		95	5
35 ciclos	desnaturalización	95	0.5
	hibridación	55	0.5
	extensión	72	1
Extensión final		72	5
Almacenaje		4	α

Se comprobó el marcaje de la sonda con DIG mediante una corrida electroforética de 1µl del producto de PCR tanto del marcado con el DIG así como del control no marcado.

4.11.4 Corrida electroforética del gel de agarosa

- Se cargó las muestras que contienen aproximadamente 30 µg de ADN con 8 µl de tampón de carga SALB10X con gelred 1:4 en un gel de agarosa al 0.8% con tampón TBE 1X preparado con un peine de dientes gruesos.
- Se dejó correr toda la noche a 20 voltios y luego se verificó que se haya separado adecuadamente los fragmentos en el transiluminador UV EPICHEMI.

4.11.5 Transferencia del ADN

- Verificada la separación de los fragmentos de ADN, se colocó el gel con mucho cuidado sobre un contenedor con 300 ml de HCl a 0.25N sobre un agitador horizontal con movimientos suaves por 15 minutos.
- Se retiró el HCl a 0.25 N (Anexo 10.5) y se lavó con mucho cuidado el gel con agua destilada.
- Se colocó el gel sobre el contenedor con 300 ml de solución de desnaturalización (Anexo 10.5) y se mantuvo en movimiento suave en el agitador horizontal por 15 minutos, se repitió este paso dos veces.
- Se retiró la solución previa y se colocó 100 ml del tampón de neutralización (Anexo 10.5) y se mantuvo en movimiento suave en el agitador horizontal por 15 minutos, se repitió este paso igualmente dos veces.

- Se cortó un pedazo de membrana de nylon del mismo tamaño del gel, asimismo se cortó dos pedazos de papel filtro grueso Whatman 3MM del mismo tamaño del gel.
- Se remojó la membrana de nylon y las papeles filtros gruesos Whatman 3MM en solución SSC 5X (Anexo 10.5).
- Se montó el sistema de transferencia mostrado en la figura 9 y se dejó la transferencia del ADN toda la noche.
- Al día siguiente se marcó con lápiz los pocillos del gel sobre la membrana nylon para saber la posición de las muestras de ADN. Se retiró con pinzas la membrana con la cara del ADN hacia arriba y se dejó secar a temperatura ambiente sobre papel absorbente por 20 minutos.
- Para fijar el ADN a la membrana, esta fue expuesta a rayos UV en el crosslinker por 10 segundos dos veces.

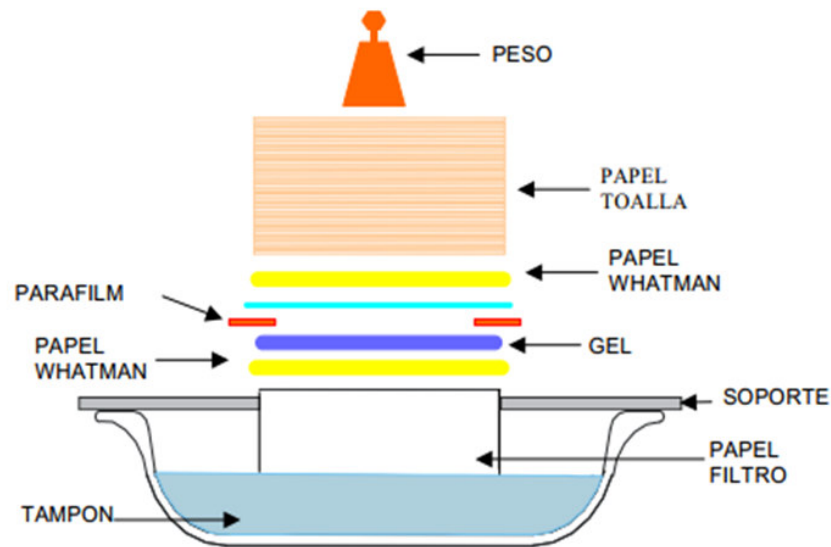


Figura 9. Esquema del montaje utilizado en la transferencia de la membrana de Southern blot (Southern 1975).

4.11.6 Hibridación de la membrana

Se siguió los siguientes pasos establecidos por el Kit de Detección Luminescente DIG de Roche.

- Se precalentó un volumen apropiado de DIG Easy Hyb (kit Roche) aproximadamente 15 ml en un tubo de hibridación, cubriendo la membrana completamente durante 30 minutos con agitación lenta a 65°C.
- Se desnaturalizó la sonda calentándola marcada con DIG* (25 ng/ml de tampón de hibridación) a 95°C en 1 ml de tampón de hibridación durante 5 minutos e inmediatamente después se colocó en hielo durante 5 minutos.
- Se removió 1 ml del tampón de hibridación y se agregó en su lugar 1 ml de la sonda desnaturalizada al tubo conteniendo la membrana.
- Se incubó con agitación suave toda la noche a 65°C en un horno de hibridación.
- Después de haber incubado la membrana toda la noche, se lavó con soluciones astringentes para remover restos de sonda no hibridada. Primero se lavó con la solución de lavado # 1 (Anexo 10.5) dos veces durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Luego se lavó con la solución de lavado # 2 (Anexo 10.5) dos veces durante 15 minutos bajo constante agitación.

4.11.7 Detección de la sonda

- Después de la hibridación y de los lavados de astringencia, se cubrió completamente con el tampón de lavado (Anexo 10.5), durante 5 minutos.
- Luego se procedió a bloquear la membrana durante 30 minutos con 50 ml de solución de bloqueo 1X (Anexo 10.5) a temperatura ambiente en agitación leve.
- Se centrifugó la solución anticuerpo anti-DIG (kit Roche) a máxima velocidad por 5 minutos a 4°C. Se tomó 4 µl y se diluyó en 40 ml de la solución de bloqueo al 1X (Dilución 1: 10 000). Se dejó reaccionar la membrana con esta solución en agitación leve por 30 minutos.
- Se lavó la membrana dos veces por 15 minutos con el tampón de lavado a temperatura ambiente en agitación vigorosa en un agitador horizontal.

- Luego se equilibró los blots de la membrana durante 5 minutos con el tampón de detección (Anexo 10.5). Pasado este tiempo se retiró el excedente del tampón.
- Se colocó la membrana, con el lado de las muestras de ADN hacia arriba, en una hoja de plástico a manera de folder y se aplicó 4 ml de solución de trabajo CSPD (dilución 1:150 de CSPD en tampón de detección). Se cubrió la membrana con esta solución y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se cubrió la membrana con la otra hoja del folder y se removió el exceso del substrato, eliminando la presencia de burbujas.
- Finalmente se colocó el folder con la membrana dentro de un casete para autorradiografía (Hypercassette, Amersham) y en completa oscuridad (cuarto oscuro) se colocó la película (Kodak, Rochester, N.Y) sobre este y se dejó reaccionar por 24 horas.

4.11.8 Revelado

- En el cuarto oscuro se abrió el casete y se retiró la película cuidadosamente. Luego esta se colocó en la solución de revelado (Kit Kodak) durante 1 minuto y 30 segundos, en agitación constante.
- Se lavó la película con agua durante 1 minuto y 30 segundos, en agitación constante.
- Se colocó la película en la solución fijadora (Kit Kodak) durante 1 minuto y 30 segundos, en agitación constante.
- Se lavó por última vez la película en agua durante 1 minuto y 30 segundos, en agitación constante y se dejó secar la película para la observación de las bandas.

V. RESULTADOS

5.1 Transformación genética

Se transformaron 511 explantes específicamente entrenudos de la variedad Desiree de *S. tuberosum*.

A partir de las 6 semanas se observaron explantes con grandes regenerantes en caso del control positivo (figura 10) y regenerantes sometidos a transformación, en menor tamaño (figura 11). Se cosechó un total de 104 regenerantes posiblemente transgénicos obteniendo una eficiencia de regeneración:

$$104/511 \times 100 = 20.35\%$$

De estos 104 regenerantes (tabla 11) solo 19 fueron considerados eventos transgénicos por pruebas de resistencia a kanamicina y por pruebas de PCR. Por lo tanto la eficiencia de transformación fue:

$$19/511 \times 100 = 3.72\%$$



Figura 10. Regenerantes de 6 semanas de edad de la variedad Desiree sin transformar.

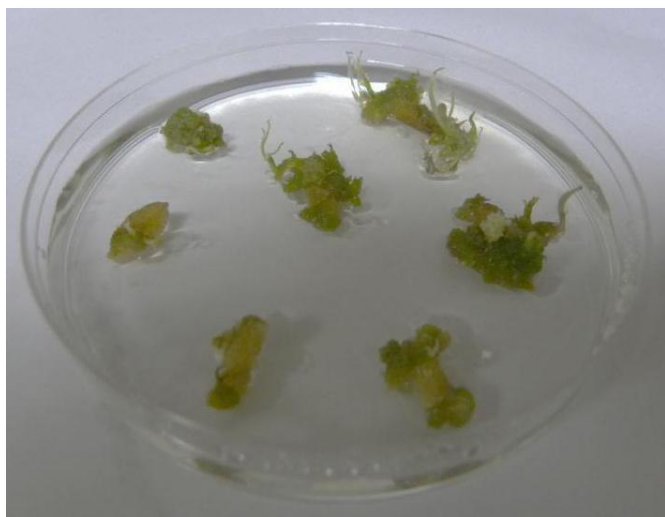


Figura 11. Regenerantes sometidos a transformación de 6 semanas de edad de la variedad Desiree.

Se evaluaron todos los regenerantes cosechados en el medio 303. De los 104 regenerantes solo 44 desarrollaron callos en el medio indicado. Los segmentos de hojas de los eventos susceptibles no formaron callos y murieron al igual que el control negativo, por la presencia del antibiótico considerándolas negativos o no transgénicos (Figura 12).

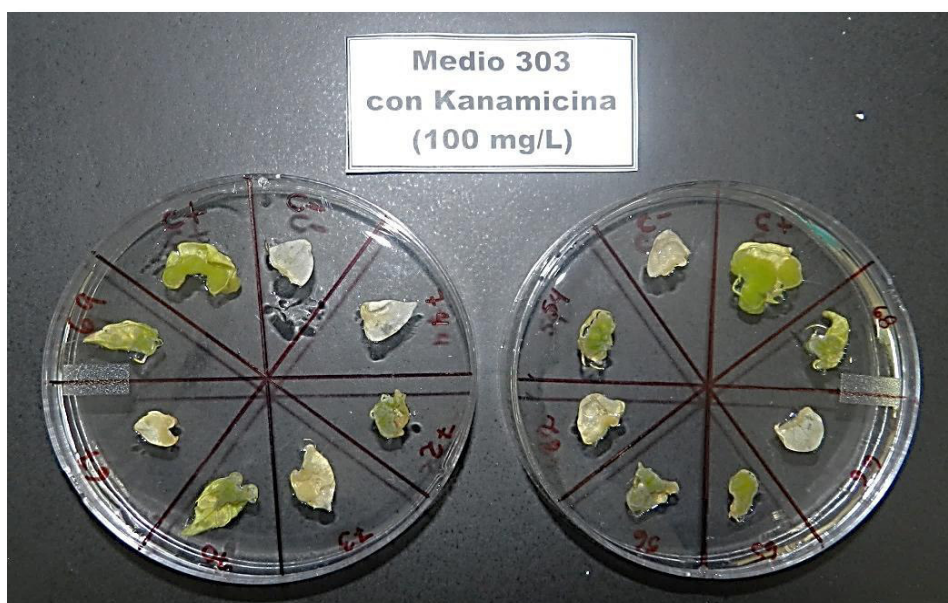


Figura 12. Formación de callos de hojas transformadas con el gen RB de los eventos 72, 70, 69, 68, 65, 56, 54. C+: control positivo, variedad WikD04 transformada resistente a kanamicina. C- control negativo variedad Desiree sin transformar.

Se procedió a evaluar los 44 regenerantes que produjeron callos mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa. En la figura 13 se muestra la calidad de ADN de los regenerantes o posibles eventos transgénicos.

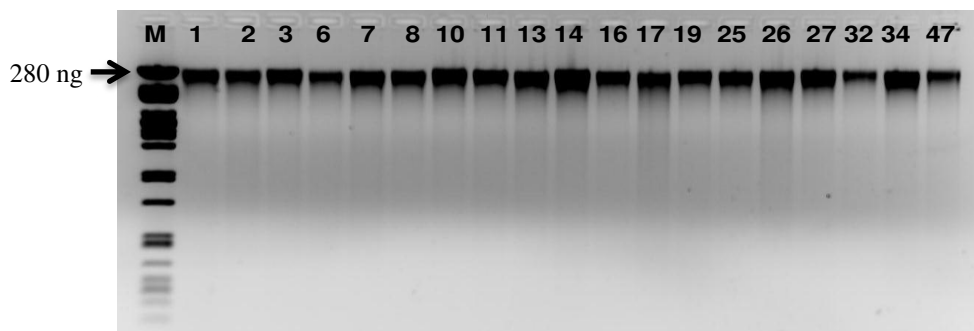


Figura 13. Calidad de muestras de ADN a pequeña escala de los posibles eventos transgénicos positivos para la prueba de resistencia a kanamicina. M: marcador de corrida λ digerido con *Pst*I donde la primera banda tiene una concentración de 280 ng.

Los iniciadores km-1 fueron probados para el gen *nptII* para los 44 regenerantes. Todos los regenerantes dieron positivo para esta prueba (Figura 14).

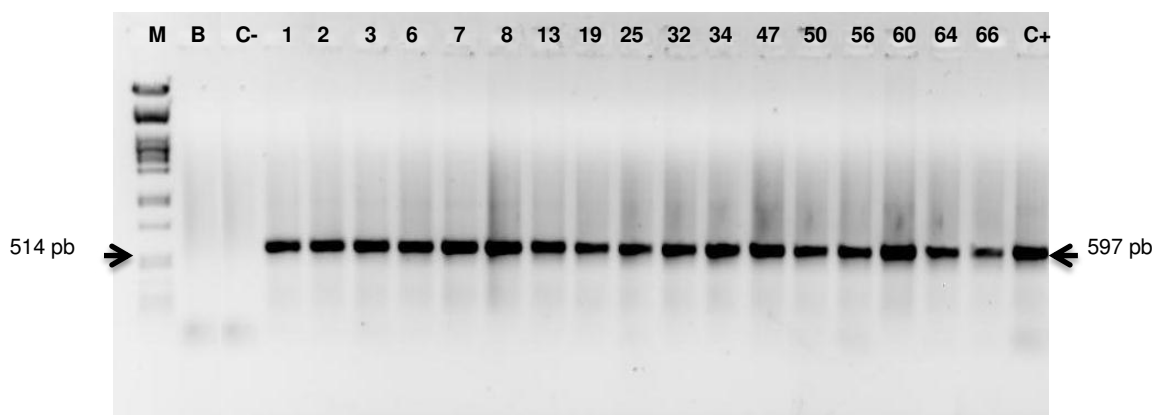


Figura 14. Posibles eventos de la variedad Desiree transgénicos, positivos para la prueba de PCR con los iniciadores km-1 el cual amplifica el gen *nptII*. El tamaño del amplicón es de 597 pb. M: marcador de corrida λ digerido con la enzima *Pst*I. B: blanco, C-: control negativo y C+: control positivo.

Los iniciadores RGA-B fueron probados para el gen RB para los 44 regenerantes. Solamente 19 de éstos fueron positivos para el gen RB denominándoseles eventos transgénicos (figura 15).

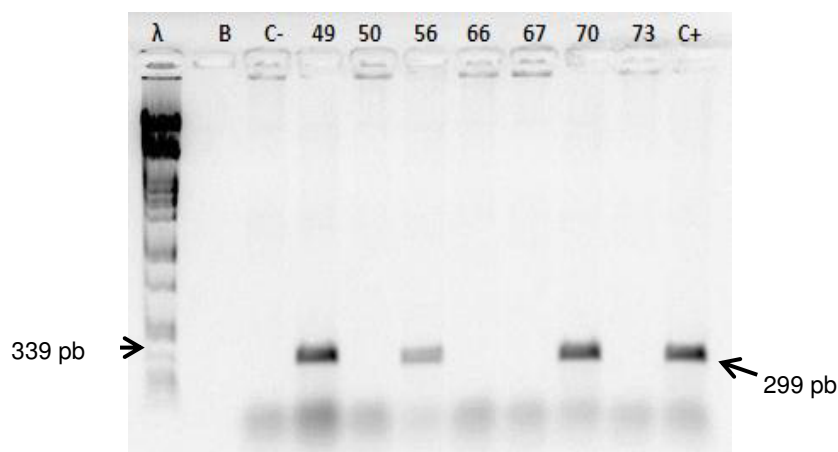


Figura 15. Eventos de la variedad Desiree putativamente transgénicos, positivos para la prueba de PCR con los iniciadores RGA-B el cual amplifica el gen RB. El tamaño del amplicón es de 299 pb. M: marcador de corrida λ digerido con la enzima *Pst*I. B: blanco, C-: control negativo y C+: control positivo.

Tabla 11. Resumen de la transformación genética en la variedad Desiree

	N°
Explantes transgénicos	511
Regenerantes cosechados	104
Regenerantes positivos para prueba de resistencia a kanamicina	44
Regenerantes positivos para prueba de resistencia a kanamicina	44
Eventos positivos para prueba de PCR con iniciadores para nptII y RB	19

5.2 Prueba de Infección con el patógeno en invernadero

Se midió el porcentaje de severidad de daño o tejido necrosado ocurrida en los eventos transgénicos con el gen RB mediante inspección visual realizada por el área de Patología del CIP. Esta lectura se realizó al quinto día y los porcentajes obtenidos fueron ajustados a la escala de Malcolmson (Anexo 10.6). Los eventos

transgénicos con el gen RB que mostraron resistencia fueron: Desiree [RB] 54, Desiree [RB] 56, y Desiree [RB] 70 como lo indica la tabla 12.

Tabla 12. Valores mostrados como promedios y \pm desviación estándar ajustadas a la escala de Malcolmson al quinto día de lectura, de los 19 eventos transgénicos con el gen RB

Eventos transgénicos	Promedio de severidad por escala de Malcolmson
Desiree[RB] 49	1.25 \pm 0.50
Desiree[RB] 51	1.25 \pm 0.50
Desiree[RB] 52	1.50 \pm 1.00
Desiree[RB] 54	7.75 \pm 0.50
Desiree[RB] 55	1.00 \pm 0.00
Desiree[RB] 56	8.75 \pm 0.50
Desiree[RB] 57	1.00 \pm 0.00
Desiree[RB] 58	1.00 \pm 0.00
Desiree[RB] 59	1.00 \pm 0.00
Desiree[RB] 60	1.00 \pm 0.00
Desiree[RB] 61	1.00 \pm 0.00
Desiree[RB] 63	1.00 \pm 0.00
Desiree[RB] 64	1.00 \pm 0.00
Desiree[RB] 65	3.25 \pm 3.20
Desiree[RB] 68	3.75 \pm 3.20
Desiree[RB] 69	2.25 \pm 0.96
Desiree[RB] 70	8.25 \pm 0.96
Desiree[RB] 71	3.00 \pm 2.16
Desiree[RB] 72	1.25 \pm 0.50
Desiree	1.00 \pm 0.00
Yungay	1.00 \pm 0.00
LBr 40	8.75 \pm 0.50

Estos datos no presentaron una distribución normal y no pudieron ser normalizados por lo tanto para procesarlos estadísticamente se usó la prueba de Kruskal Wallis mediante el programa R (Librería Agricolae). Esta prueba agrupó los eventos transgénicos con el gen RB en 5 grupos: **a**, **b**, **bc**, **cd** y **d** (desde resistentes hasta susceptibles), obteniendo como eventos resistentes a *P. infestans*: Desiree [RB] 56, Desiree [RB] 70, y Desiree [RB] 54 pertenecientes al grupo **a** descritos en la tabla 13.

Tabla 13. Agrupación de los eventos transgénicos con el gen RB en relación a su resistencia contra *P. infestans* mediante la prueba de Kruskal Wallis

Eventos transgénicos	Orden	Promedio de rangos	Grupo
LBR40	1	82.6	a
Desiree[RB] 56	2	82.6	a
Desiree[RB] 70	3	79.5	a
Desiree[RB] 54	4	75.8	a
Desiree[RB] 65	5	57.0	b
Desiree[RB] 71	6	56.5	b
Desiree[RB] 69	7	55.8	b
Desiree[RB] 68	8	49.9	bc
Desiree[RB] 52	9	38.4	cd
Desiree[RB] 49	10	37.0	cd
Desiree[RB] 72	11	37.0	cd
Desiree[RB] 51	12	37.0	cd
Desiree[RB] 60	13	29.0	d
Desiree[RB] 61	14	29.0	d
Desiree[RB] 63	15	29.0	d
Desiree[RB] 64	16	29.0	d
Desiree	17	29.0	d
Yungay	18	29.0	d
Desiree[RB] 55	19	29.0	d
Desiree[RB] 57	20	29.0	d
Desiree[RB] 58	21	29.0	d
Desiree[RB] 59	22	29.0	d

En las figuras 16 al 19 se muestran los eventos transgénicos resistentes, control o planta no transformada (Desiree control) y testigos (R: resistente y S: susceptible) al quinto día pos infección con el aislamiento POX067: Desiree [RB] 54 (figura 16), Desiree [RB] 56 (figura 17), Desiree [RB] 70 (figura 18) y las variedades Yungay (susceptible) y Lbr40 (resistente) (figura 19).



Figura 16.
A- Desiree control
B- Desiree [RB] 54



Figura 17.
A- Desiree control
B- Desiree [RB] 56



Figura 18.
A- Desiree control
B- Desiree [RB] 70



Figura 19.
A- Yungay (S)
B- Lbr40 (R)

5.3 Nivel de expresión del gen RB mediante RT-qPCR

5.3.1 Eficiencia de PCR del gen RB

Se halló el valor de la pendiente de la recta mediante el logaritmo de las diluciones seriadas (1/2) de ADNc y los valores de Cq obtenidos por los iniciadores del gen RB (Colton et al. 2006). Pendiente= -3.31. Eficiencia= 99.0%. (Figura 20).

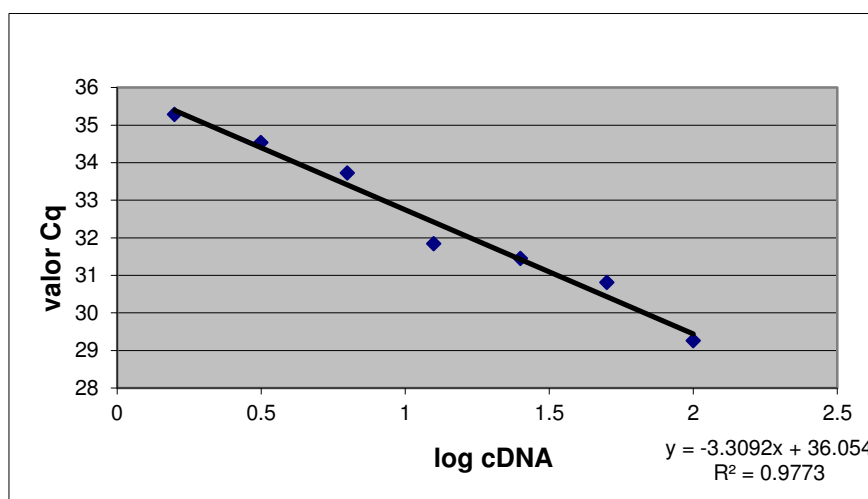


Figura 20. Eficiencia del gen RB calculada a partir de la pendiente de la curva.

5.3.2 Eficiencia de PCR del gen de referencia ef1α

Se halló el valor de la pendiente de la recta mediante el logaritmo de las diluciones seriadas (1/2) de ADNc y los valores de Cq arrojados por los iniciadores del gen ef1α (Nicot et al. 2005). Pendiente= -3.25. Eficiencia= 103.10% (Figura 21).

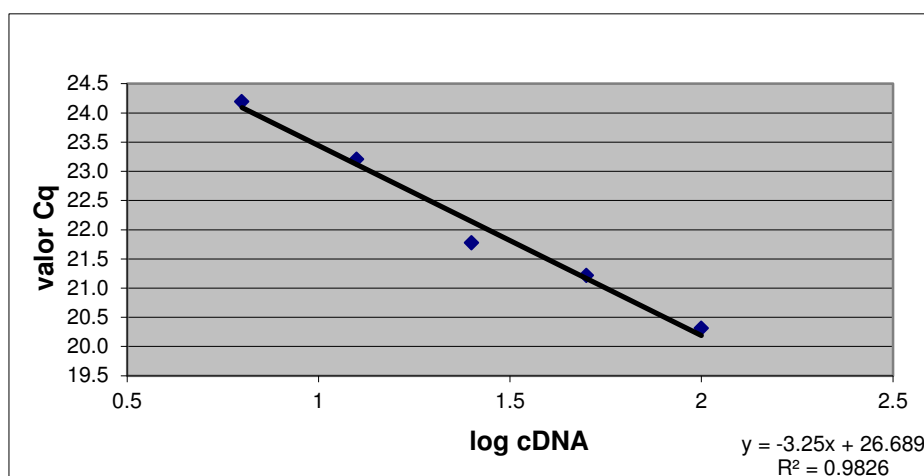


Figura 21. Eficiencia del gen *ef1α* calculada a partir de la pendiente de la curva.

5.3.3 Expresión relativa del gen RB de los eventos transgénicos

Fue normalizado con el gen *ef1α* y nos arrojó el siguiente resultado: El evento Desiree [RB] 56 mostró tener mayor nivel de expresión del gen RB, seguido por los eventos Desiree [RB] 70 y Desiree [RB] 54 (figura 22). Así mismo se observó que durante el primer y tercer día la expresión del gen RB aumenta para los tres eventos, siendo importante para determinar la resistencia al patógeno.

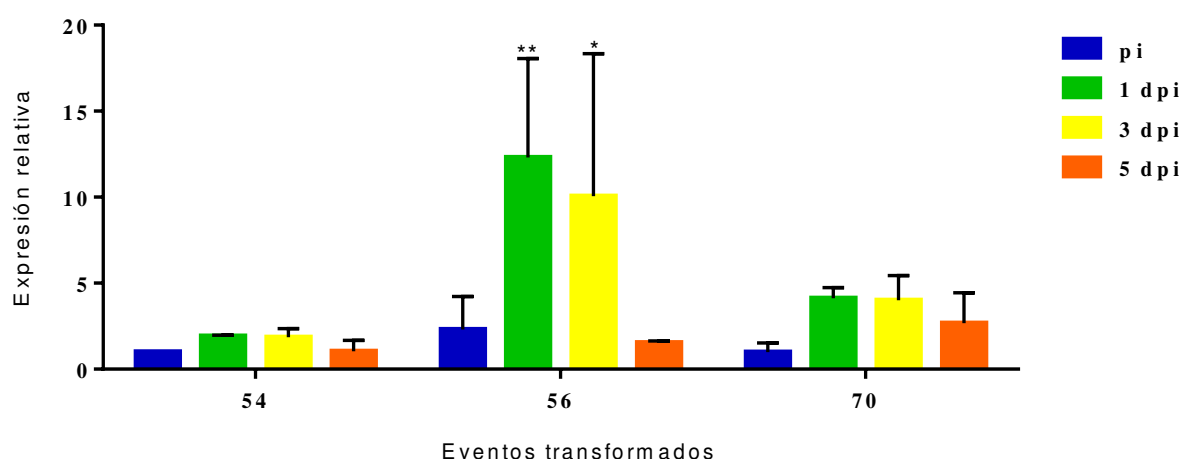


Figura 22. Expresión relativa del gen RB en los eventos transgénicos: Desiree [RB] 54, Desiree [RB] 56, y Desiree [RB] 70 en diferentes eventos de tiempo: pi (pre infección), 1 dpi (1 día pos infección), 3 dpi (3 días pos infección) y 5 dpi (5 días pos infección). ** $p < 0.01$ diferencia altamente significativa del evento [RB] 56 a 1dpi con respecto al evento [RB] 54. * $p < 0.05$ diferencia significativa del evento [RB] 56 a 3 dpi con respecto al evento [RB] 54. En los días pi y 5dpi no hubo diferencia significativa entre los eventos.

5.4 Prueba de Southern blot

Se realizó la prueba de Southern blot solamente a los eventos que presentaron resistencia y un control negativo: una planta sin haber sido sometida a transformación genética. Según la sonda y el sitio de corte *EcoRI* las bandas mayores a 7 kb, fueron consideradas como copias o inserciones completas del ADN-T. La figura 23 muestra el gel de electroforesis con las muestras de cada evento digerido con *EcoRI*.

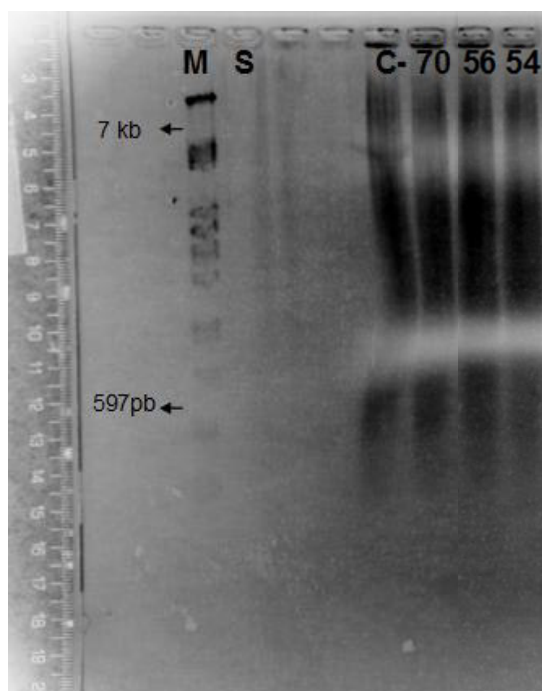


Figura 23. Corrida electroforética de los eventos transgénicos digeridos con la enzima *EcoRI* que mostraron resistencia: [RB] 70, [RB] 56 y [RB] 54. C-: control negativo, S: sonda Km-1 con un tamaño de 597 pb. M: Marcador de corrida λ digerido con *PstI*.

La figura 26 muestra la película revelada del gel electroforético mostrando las bandas lo cual significa el número de copias insertadas del gen RB en cada evento transgénico. En la tabla 14, se detalla el número de copias totales y número de copias incompletas insertadas en cada evento transgénico.

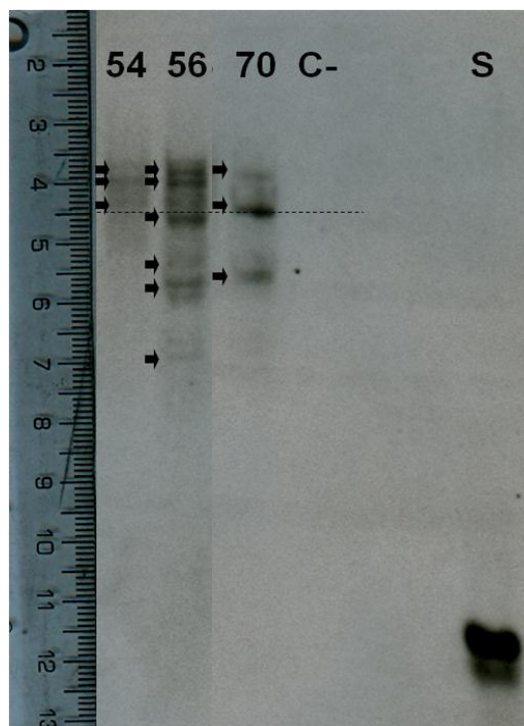


Figura 24. Película revelada de la membrana de Southern blot. Se visualizan el número de copias de los eventos transgénicos que mostraron resistencia: [RB] 54, [RB] 56 y [RB] 70. C-: control negativo, S: Sonda Km-1 con un peso de 597 pb.

Tabla 14. Indica el número total de copias insertadas por evento transgénico

Eventos transgénicos	Número total de copias
Desiree [RB] 54	3
Desiree [RB] 56	6
Desiree [RB] 70	3

VI. DISCUSIÓN

La incorporación directa de genes resistentes a *P. infestans* de especies silvestres de papa como *Solanum tuberosum* entre otros, es un paso muy importante para la obtención de nuevas variedades resistentes de papa. Esta obtención de plantas de papa transformadas o transformadas estables es relativamente sencilla, rápida y su principal ventaja es que el impacto es menor sobre la genética de la planta receptora.

En la transformación genética que se realizó en la variedad Desiree se cosechó 104 regenerantes siendo sometidos preliminarmente a la prueba de resistencia de kanamicina con la finalidad de verificar si todos fueron transgénicos. Esta prueba nos permitió evaluar de manera indirecta la expresión del gen nptII (Hellens et al. 2000). Sin embargo no se esperó que más del 50% de regenerantes fueran escapes es decir no hayan sido transgénicos por *A. tumefaciens*. El alto número de escapes se pudo deber a que los regenerantes fueron cosechados por zonas muy cercanas al corte donde se infectó con la bacteria y se formó el callo.

Solo las plantas transformadas provienen de los callos que se formaron en el mismo sitio de corte hecho por la cuchilla que contenía la bacteria y que se encuentren en contacto con el medio de regeneración Willmitzer. Esto es muy importante porque este medio al contener el antibiótico kanamicina nos permitirá desde un inicio seleccionar a los regenerantes que han incorporado adecuadamente el ADN-T. Por otro lado, si los regenerantes son cosechados cercanos al callo donde se produjo la herida y/o no estuvo en contacto con el medio, simplemente sería una plántula que no fue transformada. (Monserrat et al. 2001).

Los eventos que fueron positivos para la prueba de resistencia a kanamicina también fueron positivos para prueba de PCR específico para el gen nptII lo cual se esperaba. Sin embargo para la misma prueba de PCR con los iniciadores del gen RB, solo 19 eventos dieron positivos correspondiendo al 43% de los regenerantes cosechados obteniendo una eficiencia de transformación relativamente baja de 3.72% sabiendo que esta variedad tiene un alto índice de

regeneración y responde bien a la transformación genética (Cañedo & Cisneros 2004).

Esto se pudo deber a que solo una porción del ADN-T se incorporó en el genoma de la planta debido a una delección parcial o rearrreglos del transgén como translocaciones e inversiones. Otra posibilidad es el silenciamiento pos transcripcional lo cual ocurre en otras eventos transgénicos (Gheysen et al. 1990). El ADN-T ingresa por el borde derecho hasta el borde izquierdo, justamente el vector pCIP68 con el cual se trabajó proviene del vector pBIN19 donde en el borde derecho se encuentra el gen *nptII* y cerca al borde izquierdo el gen RB. Esto significaría que primero ingresa el gen *nptII* y luego el gen de interés siendo una posible causa que se hayan obtenido solo 19 eventos con el gen RB y *nptII* por PCR.

La caracterización molecular de los eventos transgénicos no son suficientes para determinar si estas serán o no resistentes contra el patógeno, por tal motivo es importante someter estos eventos contra el patógeno ya sea en pruebas de infección en planta entera en condiciones controladas para favorecer el desarrollo del patógeno o pruebas de infección en campo. En nuestro caso se realizó las pruebas de infección con el patógeno en planta entera a condiciones controladas ya antes explicadas (Dorrance & Inglis 1997) (Pérez 2000). Esta prueba tiene un valor cualitativo ya que se interpreta los resultados en porcentaje de daño basándose en la inspección visual del área afectada del total de la planta por el patógeno al quinto día pos infección. Se obtuvo con los porcentajes más bajo de daño a los eventos Desiree [RB] 56, Desiree [RB] 70 y [RB] 54, y agrupados según la prueba estadística de Kruskal Wallis en el grupo **a** como resistentes al aislamiento POX067. Ciertas diferencias en los porcentajes de daño entre repeticiones biológicas se podrían deber a que la aspersión del inoculo no fue homogénea entre los clones, la morfología de cada clon y la ubicación de estos cerca a los humidificadores contribuyen a que el patógeno se desarrolle más rápido. De otro lado, la prueba de infección en planta entera nos da nociones del tipo de herencia de la resistencia (Dorrance & Inglis 1997). Esta prueba fue respaldada con los resultados del nivel de expresión del gen *RB* mediante la prueba cuantitativa RT-qPCR.

El aislamiento peruano POX067 de *P. infestans* que se utilizó en el presente trabajo pertenecen al genotipo EC-1, este genotipo es considerado de las “poblaciones nuevas” predominante en los Andes del Ecuador y Perú. Sus tipos de apareamiento es el A1 y presenta diferentes niveles de resistencia al metalaxyl desplazando al genotipo US-1 distribuido mundialmente en las plantaciones de papa (Forbes et al. 1997). Asimismo, este aislamiento es considerado uno de los más agresivos en nuestro país.

Diversos estudios con plantas transformadas con el gen RB han demostrado presentar resistencia parcial en pruebas del foliolo cortado como en campo a diferentes aislamientos provenientes de diversos genotipos como US-1, US-8, US-10 y US-14 (Kuhl et al. 2007), (Halterman et al. 2008). Sin embargo tres eventos transgénicos mostraron una fuerte resistencia a este aislamiento local las cuales serían resistentes también a los genotipos US-1 entre otros considerados de las “poblaciones antiguas” que aún prevalecen en la mayoría de países de África Sub-Sahariana (Pule et al. 2013). De esta manera se puede afirmar que el gen RB tiene altos niveles de resistencia a este patógeno y tiene un amplio espectro de resistencia a diversos aislamientos (Song et al. 2003).

Para realizar la prueba de RT-qPCR se halló primero la eficiencia de PCR de los dos juegos de iniciadores en la población de ADNc, obteniendo una alta eficiencia de estos: 99% para el gen RB (iniciadores usados por Colton) y 103% para el gen *ef1α*, indicándonos que son específicos para los genes validando nuestra prueba de RT-qPCR. El gen endógeno *ef1α* ha sido anteriormente usado para normalizar los datos de expresión con otros genes diana en *Solanum tuberosum* cv contra *P. infestans* y demostró tener una expresión más estable en el tiempo (Nicot 2005) siendo el más indicado para usarlo en esta prueba. El nivel de expresión del gen RB, fue mayor para el evento [RB] 56, seguido del evento [RB] 70 y [RB] 54 coincidiendo con los resultados anteriores. Se puede determinar que el mayor nivel de expresión o mayor número de transcripto estaría relacionada a la resistencia mediada por este gen.

El nivel de expresión basal que se observa durante el día pre-infección fue similar para todos los eventos siendo más bajo para el evento [RB] 54 y más alto

para el evento [RB] 56, sin embargo durante el primer día pos infección, el número de transcritos aumentó significativamente en el evento [RB] 56. En el tercer día pos infección, el número de transcritos disminuye pero aun el evento [RB] 56 mantiene una diferencia significativa con respecto a los otros eventos. Durante el quinto día pos infección el nivel de número de transcritos se reduce para todos los eventos, llegando a ser similar al nivel de expresión basal o del día pre infección. El aumento de los transcritos del gen RB durante las 24 horas pos infección jugaría un rol muy importante en los niveles de resistencia al retardar o evitar el desarrollo del patógeno en la planta. La detección de transcripto del gen RB en los eventos transgénicos antes de ser sometidas a infección nos indica que este gen es constitutivo, luego este nivel de transcritos aumenta en respuesta al ataque del patógeno (Kramer et al. 2009). La prueba de Southern blot nos permitió verificar la presencia y número de copias del ADN-T en los eventos transgénicos siendo cada uno de ellos eventos independientes.

VII. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron tres eventos transgénicos de *Solanum tuberosum* var. Desiree con el gen RB: [RB] 54, [RB] 56 y [RB] 70 que fueron resistentes al patógeno *P. infestans* (aislamiento POX067).
2. El evento con mayor nivel de resistencia al patógeno y expresión relativa del gen RB fue el evento [RB] 56 seguido de los eventos [RB] 70 y [RB] 54.
3. Los tres eventos resistentes tuvieron dos o más copias del gen RB en su genoma.
4. El porcentaje de eficiencia de transformación en Desiree utilizando *A. tumefaciens* fue de 3.72%.

VIII. RECOMENDACIONES

Se recomienda que los eventos transgénicos con el gen RB: [RB] 54, [RB] 56 y [RB] 70 sean sembradas en campo y sometidas a la presencia de *P. Infestans* para confirmar la resistencia a este patógeno en condiciones naturales.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abad, Z. G. & Abad, J. A. 1995. Historical evidence on the occurrence of late blight potato, tomato and pear melon in the Andes of South America. In: *Phytophthora infestans* 150: Proceedings.
2. Agrios, G. (Eds.). 1995. Fitopatología. Catedrático, Departamento de Fitopatología, Universidad de Massachusetts. Editorial LIMUSA, S.A. México. pp. 317-323.
3. Alonso, F. 2002. El cultivo de la patata. Editorial Mundi- Prensa, S.A. Madrid. España. pp. 495.
4. Atkinson, P. W. 2002. Genetic engineering in insects of agricultural importance. Insect. Biochem. Mol. Biol. 32: 1237-1242.
5. BACMAP: BACTERIAL GENOME ATLAS. Disponible en: http://wishart.biology.ualberta.ca/BacMap/cgi/getSpeciesCard.cgi?accession=NC_003304&ref=index.html. Accesado enero 15, 2008.
6. Bent, A. F. 1996. Plant Resistance Genes: Function Meets Structure. Plant Cell. 8: 1757-1771.
7. Bevan, M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. Nucleic Acids Research 12: 8711-8721.
8. Beyer, K. A. Binder, T. Boller, & M. Collinge. 2001. Identification of potato genes induced during colonization by *Phytophthora infestans*. Molecular Plant Pathology 2: 125-134.
9. Birch P., A. Rehmany, L. Pritchard, S.Kamoun, J. Beynon. 2006. Trafficking arms: Oomycete effectors enter host plant cells. Trends in Microbiology. 14. 8-11.
10. Birch, P. R. & S. Whisson. 2001. *Phytophthora infestans* enters the genomics era. Molecular Plant Pathology 2: 257-263.
11. Bonas, U. & T. Lahaye. 2002. Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. Current opinion in microbiology. 5: 44-50.
12. Brenes, A. & L. Gomez-Alpizar. 2009. La variedad de papa Desiree en Costa Rica. Agronomía Costarricense. 33: 155-156.

13. Bradeen, J., M. Lorizzo, D. S. Molloy, et al. 2009. Higher copy numbers of the potato RB transgene correspond to enhanced transcript and late blight resistance levels. *Molecular Plant Microbe Interact.* 4: 437-46.
14. Cañedo, V. & F. Cisneros. 2004. Clones de papa transformadas con la toxina de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) contra la polilla de la papa, *Phthorimea operculella* (Zeller). I. transformación de clones de papa y verificación de la presencia del gen cry1A (b). *Rev. Per. Ent.* 44:89-93.
15. Champouret, N. K. Bouwmeester, H. Rietman, et al. 2009. *Phytophthora infestans* isolates Licking class I ipiO variants are virulent on Rpi-blb1 potato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12: 1535-1545.
16. Coffey, M. D. & R. Gees. 1991. The cytology of development. *In: advances in Plant Pathology. Phytophthora infestans, the cause of potato late blight of potato.* INGRAM, D.S. y WILLIAMS, P.H. Editorial ACADEMIC PRESS. Londres. Inglaterra. pp. 31-51.
17. Colton, L., H. I. Groza, S. M. Wielgus, et al. 2006. Marker-assisted selection for the broad-spectrum potato late blight resistance conferred by gene RB derived from wild potato species. *Cop Sci.* 46: 589-594.
18. Cruickshank, G., H. E. Stewart & R. L. Wastie. 1982. An illustrated assessment key for foliage blight of potatoes. *Potato Research* 25, 213-4.
19. De Mendiburu F. 2009. Una herramienta de análisis estadístico para la investigación agrícola. Tesis. Universidad Nacional de Ingeniería (UNI-PERU).
20. Doehlonan, J. M. & D. A. Sleper. 1995. Breeding Field Crops. *Iowa state University Press. Ames.* 419-433.
21. Dorrance, A. E. & D. A. Inglis. 1997. Assessment of Greenhouse and Laboratory screening methods for evaluating potato foliage for resistance to Late Blight. *Plant Disease* 81: 1206-1213.
22. Dorrance, A. E., D. A. Inglis & J.P. Helgenson. 2001. Partial resistance to *Phytophthora infestans* in four *Solanum* crosses *Am. J. Potato Res.* 78: 9-17.
23. Douches, D., J. Bamberg, et al. 2001. Evaluation of wild *Solanum* species for resistance to the US-8 genotype of *Phytophthora infestans* utilizing a fine-screening technique. *Am. J. Potato Res.* 78: 159-65.

24. Douglas, C., R. Staneloni, R. Rubin & E. Nester. 1985. Identification and genetic analysis of *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. *Plant Cell Physiol* 161: 850 – 860.
25. Drenth, A., L. J. Turkensteen & F. Govers. 1993. The occurrence of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* in The Netherlands, significance and consequences. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 99: 57- 67.
26. Erwin, D. C. & O. K. Ribeiro, (Eds.). 1996. Introduction to the genus *Phytophthora*. In: *Phytophthora* disease worldwide. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. pp. 1-7.
27. FAO (Food and Agriculture organization of the United Nations). 2006. Tesoro enterrado: La papa. Departamento de Agricultura, Bioseguridad, Nutrición y Protección del Consumidor. Roma, Italia. pp. 2. Disponible en línea: <http://www.fao.org/ag/esp/revista/pdf/0611-1.pdf> (accedido el 24/01/2008).
28. FAO (Food and Agriculture organization of the United Nations). 2010. (en línea). FAOSTAT. Production quantity. .Acceso 15/12/2013.
29. Forbes, A. G., X. Escobar, C. Ayala, et al. 1997. Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. *Phytopathology* 87: 375-380.
30. Ghanem, S. 2011. Cloning of the nptII gene of *Escherichia coli* and construction of a recombinant strain harboring functional *recA* and nptII antibiotic resistance. *Genet. Mol. Res.* 10 (3): 1445-1454.
31. Gebhart, G. & J.P.T Valkonen. 2001. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annual Review in Phytopatology* 39: 79-102.
32. Gelvin, S. 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-ADN transfer and integration. *Plant Mol. Biol.* 51: 223-256.
33. Gheysen G., R. Villarroel & M. Van Montagu. 1990. Illegitimate recombination in plants: a model for T-ADN integration. *Genes & development* 5(2):287-297. doi:10.1101/gad.5.2.287.
34. Haas B. J., S. Kamoun, M. C. Zody, et al. 2009. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* 461: 393-98.
35. Halterman D. A., L. C. Kramer, S. M. Wielgus, et al. 2008. Performance of transgenic potato containing the late blight resistance gene RB. *Plant disease* 92: 339-343.

36. Halterman, D., Y. Chen, J. Sopee, et al. 2010. Competition between *Phytophthora infestans* Effectors leads to increased aggressiveness on plants containing broad-spectrum late blight resistance. PlosOne 5: 1-10.
37. Hamester, W. & U. Hils. 2003. World catalogue of potato varieties. Agrimedia GmbH, Germany. 53-149.
38. Haverkort, A., P. Struik, & R. Visser. 2009. Applied biotechnology to combat late blight in potato caused by *Phytophthora infestans*. Potato Res 52: 249-264.
39. Helgenson J.P., J.D. Pohlman, S. Austin, et al. 1998. Somatic hybrids between *Solanum bulbocastanum* and potato: a new source of resistance to late blight. Theor. Applied Genet. Genomics. 96: 738-742.
40. Hellens, P., E. Edwards, N. Leyland, S. Bean, & P. Mullineaux. 2000. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. Plant Molecular Biology 42: 819-832.
41. Hellens, R., P. Mullineaux, y H. Klee. 2000. A guide to Agrobacterium binary Ti vectors. Trend in Plant Science 5: 446-451.
42. Hennegan, K. & K. Danna. 1998. pBIN20: An Improved Binary Vector for *Agrobacterium*- mediated transformation. Plant Molecular Biology Reporter 16: 129-131.
43. Jain, S. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. Euphytica 118: 153-166.
44. Jonak, C., L. Okr  sz & H. Hirt. 2002. Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signaling. Curr. Opin. Plant Biol 5: 415-424.
45. Kamoun, S. A. 2006. Catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. Annu. Rev. Phytopathol. 44: 41-60.
46. Klee, H., R. Horsch & S. Rogers. 1987. *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. Annual Review of Plant Physiology 38: 467-486.
47. Kok-jacon, A., J. P. Vincken, L. Suurs. 2007. Expression of alternansucrase in potato plants. Biotechnology Letters 7: 1135-1142.
48. Kramer, L., M. CHOUDOIR, M. WIELGUS. et al. 2009. Correlation between transcript abundance of the RB gene and the level of the RB- mediated late blight resistance in potato. Molecular Plant Microbe Interact. 4: 447-55.
49. Kuhl J.C., K. Zarka, J. Coombs, et al. 2007. Late Blight resistance of RB transgenic potato lines. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 132: 783-789.

50. Liu, Z & D. Halterman. 2009. Analysis of proteins differentially accumulated during potato late blight resistance mediated by the RB resistance gene. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74: 151-160.
51. Martin G. B., A. J. Bogdanove & G. Sessa. 2003. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 23-61.
52. McDonald, B. A. & C. Linde, 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40: 349-79.
53. Medina-Bolívar, F. & C. Cramer. 2004. Production of recombinant proteins by hairy roots cultured in plastic sleeve bioreactors. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 267: Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols, Second Edition.
54. MINAGRI (Ministerio de Agricultura del Perú). 2012. (en línea). La Papa. Acceso 16/03/2014.
55. Mendoza, A. 1998. Manejo integrado de la ranca en el cultivo de la papa. Universidad Nacional Hermilio Valdizan. Manual Técnico. Huánuco. 43 pp
56. Monserrat, E., V. Marfa, E. Mele, & J. Messengue. 2001. Study of different antibiotic combinations for use in the elimination of *Agrobacterium* with kanamycin selection in carnation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 65: 211-220.
57. Naess, S. K., J. M. Bradeen, S. M. Wielgus, et al. 2001. Analysis of the introgression of *Solanum bulbocastanum* ADN into potato breeding lines. *Mol. Genet. Genomics*. 265: 694-704.
58. Nicot, N., J. Hausman, L. Hoffmann, & D. Evers. 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 56(421): 2907-2914.
59. NIVAP. 2007. Netherlands catalogue of potato varieties. Netherlands Potato Consultative Foundation 117.
60. Ñopo, L., G. Medrano & M. Ghislain. 2005. Applied biotechnology laboratory protocols: Genetic engineering of potato and sweet potato: Production, selection, testing. The International Potato Center, Lima, Perú. 87 pp.
61. Opabode, J. T. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. *Biotechnology and Molecular Biology*. Review 1 (1): 12-20.

62. Ordeñana, K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo Integrado de Plagas. pp. 22-32.
63. Ordóñez, M. 1993. Identificación de Genes Mayores de Resistencia a *Phytophthora infestans* en Patata (*Solanum tuberosum*). Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Quito: PUCE.
64. Pfaffl, M., G. Horgan, & L. Dempfle. 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Res. 30(9):e36.
65. Pfaffl, M. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. Disponible en <http://gene-quantification.eu/chapter-3-pfaffl.pdf>
66. Perez, W. 2000. Evaluation of potato species for Resistance to Late Blight. CIP Program Report. 49-62.
67. Perez, W., J. Gamboa., Y. Falcon, et al. 2001. Genetic structure of Peruvian populations of *Phytophthora infestans*. Phytopathology 91: 956-965.
68. Perez, W. & G. Forbes. 2008. Manual técnico: el tizón tardío de la papa. Centro Internacional de la papa.
69. Pérez W., J. Lara & G.A Forbes, et al. 2009. Resistance to metalaxyl-M and cymoxanil in a dominant clonal lineage of *Phytophthora infestans* in Huánuco, Peru, an area of continuous potato production. European Journal of Plant Pathology 125:87- 95.
70. Pule B. B., J. C. Meitz, A.H. Thompson, et al. 2009. Two clonal lineages of *Phytophthora infestans* prevail within Sub-Saharan African countries. Proceedings of the 10th International Epidemiology Workshop. Pp: 95-96.
71. Raffaele S., R. A. Farrer, L. M. Cano, et al. 2010. Genome evolution following host jumps in the Irish potato famine pathogen lineage. Science 330: 1540-43.
72. Ramessar, K., A. Peremarti, S. Gomez-Galera, et al. 2007. Biosafety and risk assessment framework for selectable marker genes in transgenic crop plants: a case of science not supporting the politics. Transgenic Res. 16: 261-280.
73. Rogers, S., H. Klee, R. Horsch, & R. Fraley. 1993. Use of cointegrating Ti plasmid vectors. Plant Molecular Biology Manual 1-12.
74. Sheng, O. J. & V. Citovsky. 1996. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins will travel. Plant Cell 23: 1699-1710.
75. Spooner D. & W. L. Hetterscheid. 2006. Origins, evolution, and group classification of cultivated potatoes. In T. J. Motley, N. Zerega, and H. Cross

- [eds.], Darwin ' s harvest: New approaches to the origins, evolution, and conservation of crops, 285 – 307. Columbia University Press, New York, New York, USA.
76. Song, J., S. Bradeen & K. Naess. 2003. Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. PNAS. 100: 9128-9133.
 77. Southern, E. M. 1975: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. Journal Molecular Biology. 98:503-517.
 78. Srivastava, V., O. D. Anderson, & D. W. Ow. 1999. Single-copy transgenic wheat generated through the resolution of complex integration patterns PLBr40. Natl. Acad. Sci. USA 96: 11117-11121.
 79. Staskawics, B. J., F. M. Ausubel, B. J. Baker, et al. 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. Science 268: 661-667.
 80. Tzfira, T. & Citovsky, V. 2002. Partners-in- infection: Host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. Trends Cell Biol.12: 21-129
 81. Umaerus, V. & Umaerus, M. 1994. Potato Genetics (CAB International, Wallingford, U.K) pp. 365-401.
 82. Van Poppel, P. M., J. Guo., P. J. Van de Vondervoort, et al. 2008. The *Phytophthora infestans* avirulence gene *Avr4* encodes an RXLR-dEER effector. Mol. Plant Microbe Interact.21: 1460-1470.
 83. Veena, J., R. Doerge & B. Stanton. 2003. Transfer of T-ADN and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression. The Plant Journal 35: 219-236.
 84. Villamón F. G., D.M. Spooner, M. Orrillo, et al. 2005. Late blight resistance linkages in a novel cross of the wild potato species *Solanum paucissectum* (series Piurana) Theoretical Applied Genetics 111:1201–1214. doi: 10.1007/s00122-005-0053-9.
 85. Vleeshouwers V. G., H. Rietman, P. Krenek, et al. 2008. Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes. PlosOne 3:e2845.
 86. Wastie, R. L. 1991. *Phytophthora infestans*: The cause of the Late Blight of potato. Advances in Plant Pathology. 7: 193-223.

87. Yin, Z., W. Plader & S. Malepszy. 2004. Transgene inheritance in plants. *J. Appl. Genet.* 45: 127-144.
88. Zhao, Y., T. Cai, L. Tagliani, et al. 2000. Agrobacterium mediated sorghum transformation. *Plant Mol. Biol.* 44: 789-798.

X. ANEXOS

Anexo 10.1 Medios utilizados en el crecimiento bacteriano

- Medio semisólido LB (Luria Bertani)

Compuesto	1 L
Extracto de levadura	5 g
Tryptona	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Agar*	15 g

Ajustar a pH 7. Autoclavar a 121° C por 15 minutos.

*Solo si el medio es semisólido..

Anexo 10.2 Preparación de antibióticos utilizados en la selección bacteriana

- Kanamicina (100 000 mg/L)

Disolver 1 g con agua destilada hasta completar un volumen de 10 mL. Esterilizar por filtración. Conservar a -20°C.

Anexo 10. 3 Soluciones utilizadas para electroforesis.

- EDTA.

Reactivos	PM	Para 1000 mL	Concentración final de stock
EDTA, sal disodio, dihidratado	372.20 g/mol	186.1 g	0.5 M
Pepitas de NaOH		50 pepitas	
Ajustar pH a 8.0.			

- **TBE 10X**

Reactivos	PM	Para 1000 mL	Concentración final de stock
Tris ®	121,14 g/mol	108 g	892 mM
Ácido Bórico	61,814 g/mol	55 g	889 mM
EDTA 0.5 M pH 8.0,	372,20 g/mol	40 mL	20 mM

- **SALB 10X**

Compuesto	50 mL
Azul de Bromofenol	75 mg
Xilen cianol	75 mg
Naranja G	100 mg
Sucrosa	30 g
TBE 10X	2.5 mL
H ₂ O	50 mL

Para correr una muestra de 10 µL se usa 0.87 µL de SALB más 0.13 µL de gelred (1:4).

- **Agua DEPC (1X)**

Compuesto	1L
DEPC	1 mL
Agua mili-Q	1000 mL

Dejar disolviendo 24 horas en oscuridad, autoclavar y enfriar.

- Preparación del marcador λ digerido con la enzima *Pst*I.

Reactivos	Cantidad
ADN de λ	100 μ L
<i>Pst</i> I (10 U/ μ L)	10 μ L
Tampón 10X para <i>Pst</i> I	90 μ L
Agua libre de nucleasas	(*) μ L
Volumen final	900 μ L

(*) Volumen necesario para completar 900 μ L

- Incubar a 37°C por 2 horas.
- Tomar 3 μ L de muestra y correr en un gel de agarosa para verificar si la digestión es completa.
- Añadir 100 μ L de SALB 10X y guardar a -20°C.

Anexo 10.4 Medios utilizados en el desarrollo de las plantas.

- Medio MSA

Compuesto	1L
Sales Murashige & Skoog	4.3g
Solución base MSA*	5.0 mL
Sucrosa	25g
gelrite	2g

Ajustar el pH a 5.6 y autoclavar a 121°C por 15 minutos.

*solución base MSA (Stock)

Compuesto	500 mL
Ácido giberélico	0.01g
Glicina	0.30g
Acido nicotínico	0.075g
piridoxina	0.075g
Tiamina HCL	0.06g

Ajustar el pH a 5.6 y autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Para preparar el medio MSA líquido, no se agrega el gelificante gelrite.

- **Medio Co-cultivo MS**

Compuesto	1L
Sales Murashige & Skoog	4.3g
Sucrosa	20g
Gelrite	2g

Ajustar el pH a 5.6 y autoclavar a 121° C por 15 minutos.

- **Medio Willmitzer**

Compuesto	1 L
Sales MS	4.43 g
Mix de vitaminas	1 mL
sucrosa	20 g
2,4D*	200 µL
BAP*	2.5 mL
Carbanicilina*	1.25 mL
Kanamicina*	1 mL

Ajustar el pH a 5.7 y autoclavar a 121° C por 15 minutos.

* Se agrega luego de que el medio haya sido autoclavado y enfriado

- **Medio 303**

Compuesto	1 L
Sales MS	4.43 g
Manitol	20 g
Glucosa	20 g
MES	0.5 g
Polivinil pirrolidona (PVP)	0.5 g
Glutamina	0.2 g
Adenina (sulfato)	0.04 g
Phytigel	3 g
Vitaminas GAP*	1 mL
Zeatina Ribosida*	1 mL
ANA*	100 µL
Kanamicina*	2 mL

Ajustar a pH 5.7 y autoclavar a 121° C por 15 minutos.

* Se agrega luego de que el medio haya sido autoclavado y enfriado

Preparación de hormonas.

- Ácido giberélico (5,000 mg/L)
Disolver 50 mg con 500 µL de etanol y añadir agua destilada hasta completar un volumen de 50 mL. Esterilizar por filtración.
Conservar a -20°C.
- Ácido naftalenacético (1,000 mg/L)
Disolver 100 mg con 100 µL de KOH 1M y añadir agua destilada hasta completar un volumen de 100 mL. Esterilizar por filtración.
Conservar a -20°C.
- Ribósido de zeatina (1,000 mg/L)
Disolver 20 mg con 300 µL de KOH 1M y añadir agua destilada hasta completar un volumen de 20 mL. Esterilizar por filtración.
Conservar a -20°C.
- N⁶-Bencil-adenina (BAP)
Disolver 100 mg con 100 µL de agua destilada hasta completar un volumen de 100 mL. Esterilizar por filtración. Conservar a -20°C.

Preparación de antibióticos para los medios de cultivo *in vitro*.

- Carbenicilina (200,000 mg/L)
Disolver 1 g con agua destilada hasta completar un volumen de 5 mL.
Esterilizar por filtración. Conservar a -20°C.
- Kanamicina (100,000 mg/L)
Disolver 1 g con agua destilada hasta completar un volumen de 10 mL.
Esterilizar por filtración. Conservar a -20°C.

Anexo 10.5 Soluciones utilizadas en la extracción de ADN vegetal genómico y en Southern blot

- **Tampón CTAB 2X**

Compuesto	1 L
CTAB (bromuro de cetil-trimetil-amonio)	20 g
NaCl	81.81 g
EDTA 0.5M pH8.0 (ácido etilen-diamino-tetra acético)	40 mL
Tris®-HCl 1M pH8.0	100 mL
PVP (polivinil pirrolidona)	10 g
Agua destilada	1000 mL

El CTAB y el PVP se agregan cuando la solución está caliente y luego de haber agregado todos los demás componentes.

- **Lavado #1. Extracción de ADN mediana escala**

Compuesto	Concentración final	500 mL
Etanol absoluto	76 %	380 mL
Acetato de sodio 1M	0.2 M	40 mL
H ₂ O (d)		80 mL

- **Lavado # 2. Extracción de ADN mediana escala**

Compuesto	Concentración final	500 mL
Etanol absoluto	76 %	380 mL
Acetato de sodio 1M	10 mM	5 mL
H ₂ O (d)		115 mL

- **Ácido clorhídrico 0.25 N**

Compuesto	Concentración final	1L
HCl	0.25 M	20.80 mL
H ₂ O (d)		1000 mL

- **Solución de desnaturalización**

Compuesto	Concentración final	1L
Na OH	0.5 M	20 g
NaCl	1.5 M	87 g

- **Solución de neutralización**

Compuesto	Concentración final	1L
Tris	1 M	121.14g
NaCl	1.5 M	87 g

Ajustar el pH a 8.

- **Solución SSC 20X (Stock)**

Compuesto	Concentración final	1L
Citrato de sodio tribásico dihidratado	0.3 M	88.23 g
NaCl	3 M	174 g

Ajustar el pH a 8 con NaOH concentrado

- **Lavado # 1. Southern blot**

Compuesto	Concentración final	100 ml
Acetato de sodio	0.2 M	1.64 g
Etanol absoluto	75 %	75 mL
H ₂ O (d)		16 mL

- **Lavado # 2. Southern blot**

Compuesto	Concentración final	100 ml
Acetato de amonio	10 mM	0.077 g
Etanol absoluto	75 %	75 mL
H ₂ O (d)		16 mL

Disolver el Acetato de amonio previamente en agua antes de agregarle el etanol.

- **Tampón de lavado. Southern blot**

Para esta solución se necesita preparar ácido maléico

Compuesto	Concentración final	1L
Ácido maléico	0.1 M	16 g
NaCl	0.15 M	75 mL
H ₂ O (d)		1000 mL
Ajustar el pH a 7.5		

Tampón de lavado: ácido maleico más 0.3% de tween 20.

Compuesto	300 mL
Ácido maléico	300 mL
Tween 20	900 µL

- **Solución de bloqueo 1X. Southern blot**

Compuesto	100 mL
Solución Blocking 10X (kit LBr40he)	10 mL
Ácido maléico	90 mL

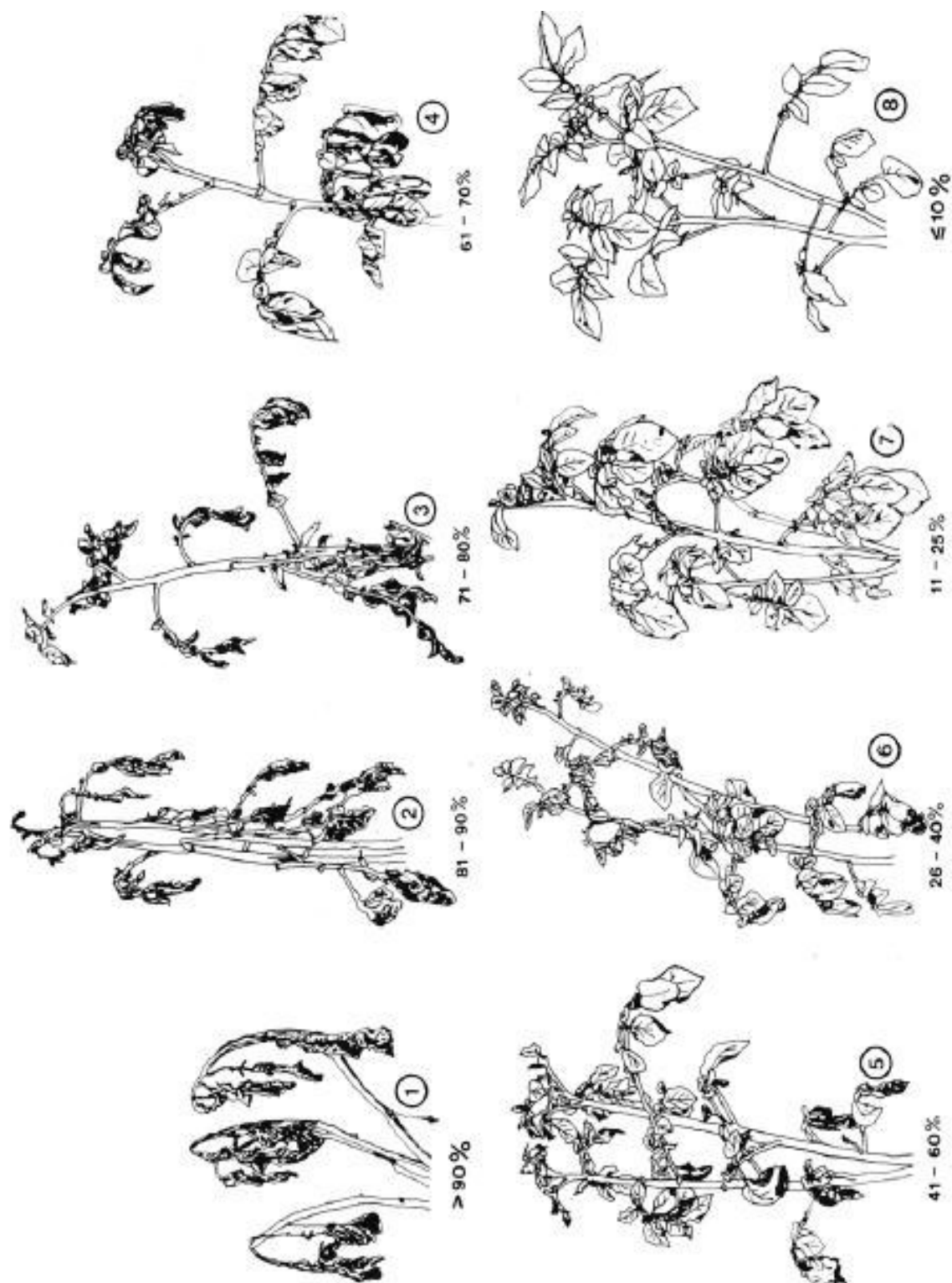
- **Tampón de detección. Southern blot**

Compuesto	Concentración final	1L
Tris-HCl	0.1 M	12.14 g
NaCl	0.1 M	5.84 g
H ₂ O (d)		1000 mL

Ajustar el pH a 7.5

Anexo 10.6 Escala de Malcolmsom

Mide el porcentaje de severidad de daño causado por *P. infestans* en la planta.



Anexo 10.7 Análisis con el programa R (Agricolae)

Evento	tratamiento repeticiones pox067 pox067			
1 Desiree[RB] 49	1	1	100	1
2 Desiree[RB] 51	2	1	90	2
3 Desiree[RB] 52	3	1	80	3
4 Desiree[RB] 54	4	1	5	8
5 Desiree[RB] 55	5	1	100	1
6 Desiree[RB] 56	6	1	0	9
7 Desiree[RB] 57	7	1	100	1
8 Desiree[RB] 58	8	1	100	1
9 Desiree[RB] 59	9	1	100	1
10 Desiree[RB] 60	10	1	100	1
11 Desiree[RB] 61	11	1	100	1
12 Desiree[RB] 63	12	1	100	1
13 Desiree[RB] 64	13	1	100	1
14 Desiree[RB] 65	14	1	10	8
15 Desiree[RB] 68	15	1	100	1
16 Desiree[RB] 69	16	1	80	3
17 Desiree[RB] 70	17	1	0	9
18 Desiree[RB] 71	18	1	40	6
19 Desiree[RB] 72	19	1	90	2
20 Desiree	20	1	100	1
21 Yungay	21	1	100	1
22 LBR40	22	1	0	9
23 Desiree[RB] 49	1	2	90	2
24 Desiree[RB] 51	2	2	100	1
25 Desiree[RB] 52	3	2	100	1
26 Desiree[RB] 54	4	2	10	8
27 Desiree[RB] 55	5	2	100	1
28 Desiree[RB] 56	6	2	0	9
29 Desiree[RB] 57	7	2	100	1
30 Desiree[RB] 58	8	2	100	1
31 Desiree[RB] 59	9	2	100	1
32 Desiree[RB] 60	10	2	100	1

33	Desiree[RB] 61	11	2	100	1
34	Desiree[RB] 63	12	2	100	1
35	Desiree[RB] 64	13	2	100	1
36	Desiree[RB] 65	14	2	100	1
37	Desiree[RB] 68	15	2	20	7
38	Desiree[RB] 69	16	2	90	2
39	Desiree[RB] 70	17	2	0	9
40	Desiree[RB] 71	18	2	90	2
41	Desiree[RB] 72	19	2	100	1
42	Desiree	20	2	100	1
43	Yungay	21	2	100	1
44	LBR40	22	2	0	9
45	Desiree[RB] 49	1	3	100	1
46	Desiree[RB] 51	2	3	100	1
47	Desiree[RB] 52	3	3	100	1
48	Desiree[RB] 54	4	3	5	8
49	Desiree[RB] 55	5	3	100	1
50	Desiree[RB] 56	6	3	5	8
51	Desiree[RB] 57	7	3	100	1
52	Desiree[RB] 58	8	3	100	1
53	Desiree[RB] 59	9	3	100	1
54	Desiree[RB] 60	10	3	100	1
55	Desiree[RB] 61	11	3	100	1
56	Desiree[RB] 63	12	3	100	1
57	Desiree[RB] 64	13	3	100	1
58	Desiree[RB] 65	14	3	90	2
59	Desiree[RB] 68	15	3	100	1
60	Desiree[RB] 69	16	3	80	3
61	Desiree[RB] 70	17	3	15	7
62	Desiree[RB] 71	18	3	100	1
63	Desiree[RB] 72	19	3	100	1
64	Desiree	20	3	100	1
65	Yungay	21	3	100	1
66	LBR40	22	3	5	8

67	Desiree[RB]	49	1	4	100	1
68	Desiree[RB]	51	2	4	100	1
69	Desiree[RB]	52	3	4	100	1
70	Desiree[RB]	54	4	4	20	7
71	Desiree[RB]	55	5	4	100	1
72	Desiree[RB]	56	6	4	0	9
73	Desiree[RB]	57	7	4	100	1
74	Desiree[RB]	58	8	4	100	1
75	Desiree[RB]	59	9	4	100	1
76	Desiree[RB]	60	10	4	100	1
77	Desiree[RB]	61	11	4	100	1
78	Desiree[RB]	63	12	4	100	1
79	Desiree[RB]	64	13	4	100	1
80	Desiree[RB]	65	14	4	90	2
81	Desiree[RB]	68	15	4	30	6
82	Desiree[RB]	69	16	4	100	1
83	Desiree[RB]	70	17	4	5	8
84	Desiree[RB]	71	18	4	80	3
85	Desiree[RB]	72	19	4	100	1
86	Desiree		20	4	100	1
87	Yungay		21	4	100	1
88	LBR40		22	4	0	9

```
> attach(data)
```

```
> comparison<-kruskal(pox067cod,tratamiento,group=TRUE)
```

```
> comparison
```

```
$statistics
```

```
Chisq    p.chisq    LSD
```

```
68.95343 5.165912e-07 16.07452
```

```
$parameters
```

```
Df ntr t.value
```

```
21 22 1.996564
```

\$rankMeans

Tratamiento	pox067cod r	
1	1	37.000 4
2	10	29.000 4
3	11	29.000 4
4	12	29.000 4
5	13	29.000 4
6	14	57.000 4
7	15	49.875 4
8	16	55.750 4
9	17	79.500 4
10	18	56.500 4
11	19	37.000 4
12	2	37.000 4
13	20	29.000 4
14	21	29.000 4
15	22	82.625 4
16	3	38.375 4
17	4	75.750 4
18	5	29.000 4
19	6	82.625 4
20	7	29.000 4
21	8	29.000 4
22	9	29.000 4

\$comparison

NULL

\$groups

trt	means	M
1	22 82.625	a
2	6 82.625	a
3	17 79.500	a
4	4 75.750	a

5	14	57.000	b
6	18	56.500	b
7	16	55.750	b
8	15	49.875	bc
9	3	38.375	cd
10	1	37.000	cd
11	19	37.000	cd
12	2	37.000	cd
13	10	29.000	d
14	11	29.000	d
15	12	29.000	d
16	13	29.000	d
17	20	29.000	d
18	21	29.000	d
19	5	29.000	d
20	7	29.000	d
21	8	29.000	d
22	9	29.000	d

Anexo 10.8 Figuras de Transformación Genética con *A. tumefaciens*



Figura 25. Variedad Desiree a las 3 semanas de edad.



Figura 26. Contacto del bisturí con la bacteria *A. tumefaciens* que contiene el vector pCIP68.



Figura 27. Retiro de las plántulas de las magentas mediante el corte con el bisturí.



Figura 28. Retiro de las hojas con peciolo de las plántulas.



Figura 29. Corte transversal de entrenudos de las plántulas con el bisturí que contiene *A. tumefaciens*.



Figura 30. Entrenudos infectados con *A. tumefaciens* en medio de co- cultivo MS.